



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA

**COMPARACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A FLUCONAZOL EN CÉLULAS
PLANCTÓNICAS Y *BIOFILMS* DE *CANDIDA ALBICANS* OBTENIDAS DE AISLADOS
CLÍNICOS DE PACIENTES CON ESTOMATITIS**

Daniela Andrea Parodi Pérez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alfredo Molina Berríos

TUTORES ASOCIADOS

Dr. José Jara

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/001
Santiago - Chile
2022



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA

**COMPARACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A FLUCONAZOL EN CÉLULAS
PLANCTÓNICAS Y *BIOFILMS* DE *CANDIDA ALBICANS* OBTENIDAS DE AISLADOS
CLÍNICOS DE PACIENTES CON ESTOMATITIS**

Daniela Andrea Parodi Pérez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alfredo Molina Berríos

TUTORES ASOCIADOS

Dr. José Jara

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/001
Santiago - Chile
2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría darle las gracias al Dr. Alfredo Molina por su guía, apoyo y por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en el laboratorio de farmacología. También al Dr. José Jara por su apoyo y consejos en cada seminario de laboratorio.

A Constanza Leiva mi amiga y compañera clínica, la mejor que pude tener. Sin ella la clínica no habría sido lo mismo, gracias por el apoyo en los momentos más difíciles de la carrera. En especial gracias por tu amistad, por estar ahí siempre, por todas las risas y buenos momentos que pasamos juntas.

A Pía Erices, Rocío Lagos, Catalina Reyes y Catalina Rodríguez por su amistad, por siempre compartir conocimientos y enseñanzas, por tantas juntas, risas y anécdotas. Con ustedes y la Coni encontré las mejores amigas que podría tener, y hasta el día de hoy a pesar de la distancia siguen ahí brindándome su apoyo.

A mi hermana Constanza Parodi mi mejor amiga, quien siempre confió en mí y me dio el ánimo y fuerza que necesitaba en los momentos difíciles, apoyándome siempre en cada locura que se me ha ocurrido, siendo fundamental en cada parte de este proceso.

A Mildred y Claudio mis papás por la paciencia durante este largo camino, y que, a pesar de los momentos difíciles, han sido un ejemplo de lucha y perseverancia.

A Félix gracias por apoyarme incondicionalmente, por la paciencia durante todos estos años, por creer siempre en mí y ser mi fan número uno desde el primer día. Por contenerme y apoyarme en los peores momentos cuando todo se veía cuesta arriba.

A Nicolás Páez mi bachi querido, siempre ahí apoyando y siendo un gran compañero y amigo, preocupado de que todo ande bien, gracias por todos estos años de amistad persiguiendo el sueño de ser dentistas.

A Carolina Verdejo con quien me reencontré en la facultad después de muchos años y retomamos una gran amistad, quien me motiva a hacer cosas nuevas y logra sacarme una sonrisa siempre.

A cada uno de los pacientes que me dio la oportunidad de aprender, que confió en mí para su atención, teniendo mucha paciencia en el proceso y permitiendo mi formación como odontóloga.

A profesoras y profesores que me apoyaron, que me entregaron sus conocimientos siendo parte de mi formación. Y a cada funcionaria y funcionario que me dio una palabra de aliento y una sonrisa en los pasillos de la universidad.

Gracias a todos quienes fueron parte de este proceso.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| . MARCO TEÓRICO | 3 |
| Clasificación y diagnóstico de estomatitis subprotésica | 3 |
| Levadura de género Candida | 6 |
| Características y desarrollo de biofilm de Candida albicans | 9 |
| Mecanismo de resistencia de biofilms | 10 |
| Tratamiento de estomatitis subprotésica | 14 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 19 |
| 4. OBJETIVOS | 19 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 20 |
| 6. RESULTADOS..... | 26 |
| 7. DISCUSIÓN | 38 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 42 |
| 9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS | 43 |

1. RESUMEN

Introducción

La estomatitis subprotésica es una patología oral muy frecuente en pacientes portadores de prótesis. Es la candidiasis oral más común, siendo el agente causal más comúnmente aislado *Candida albicans*. Actualmente el tratamiento consiste en controlar cualquier efecto traumático que pueda generar la prótesis, en conjunto con antifúngicos tópicos. Este tratamiento genera resistencia y recidiva debido a la presencia de *biofilm* sobre la superficie de prótesis y mucosas. Lo mismo ocurre en otros tipos de candidiasis las cuales son muy difíciles de tratar con antifúngicos comunes. Esto ha impulsado la búsqueda de otros tratamientos; sin embargo, faltan estudios sobre el comportamiento de estas terapias en *biofilms* de *C. albicans* para poder lograr tratamientos exitosos. Es por esto que se estudió la susceptibilidad a fluconazol de cepas clínicas de *C. albicans* de pacientes con estomatitis subprotésica, en su forma planctónica y en *biofilm*, con el objetivo de evaluar algún cambio en la susceptibilidad de estas cepas.

Materiales y métodos

Se realizaron ensayos de microdilución en placas de 96 pocillos para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de Fluconazol sobre cepas clínicas aisladas de *C. albicans* en su forma planctónica y en *biofilms*. Luego se clasificaron en cepas resistentes y susceptibles a Fluconazol según valores documentados, para luego comparar el efecto antifúngico que logra el Fluconazol en células planctónicas y *biofilm*.

Resultados

El fluconazol demostró inhibir a células planctónicas de diferentes cepas clínicas de *C. albicans*, siendo en su gran mayoría susceptibles, encontrándose valores de IC₅₀ aceptados para fluconazol. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando se encuentra en *biofilm*, por el contrario, todas las cepas estudiadas pasaron a ser resistentes a fluconazol en concentraciones muy altas sobre 6mg/L. Incluso en algunas cepas se favoreció el crecimiento celular en presencia de fluconazol.

Conclusiones

C. albicans es susceptible a fluconazol cuando se encuentra aislada en su forma planctónica, sin embargo, su susceptibilidad cambia volviéndose resistente a fluconazol cuando se encuentra en *biofilm*, siendo esta la forma de organización habitual. Es de vital importancia estudiar el efecto anti-*biofilm* de tratamientos antimicóticos, para evitar generar resistencia y llegar a un tratamiento eficaz para la estomatitis subprotésica.

2. MARCO TEÓRICO

Las lesiones en la mucosa oral son muy prevalentes en la población y se caracterizan por tener una etiología variada, desde lesiones traumáticas, inflamatorias, autoinmunes, neoplásicas hasta lesiones de origen infeccioso bacteriano, viral o fúngico. Dentro de estas últimas, la candidiasis es reconocida como la causa más común y puede presentarse en diferentes formas y variedades clínicas, a lo largo de todo el sistema gastrointestinal, oral, vaginal y sobre superficies inertes como prótesis y sondas (Warnakulasuriya, 2019).

Dentro de las candidiasis orales la estomatitis subprotésica es una de las más frecuentes, la cual se encuentra asociada al uso de prótesis removibles (Cueto et al., 2013; Rivera et al., 2017). Estudios epidemiológicos reportan una prevalencia de un 15% a un 70%, variación que depende de la población de estudio (Gendreau & Loewy, 2011). Por otro lado, en Chile, los estudios epidemiológicos realizados en adultos mayores portadores de prótesis removibles reportan una prevalencia entre 56%- 68% (Gutiérrez et al., 2013; Lee Muñoz et al., 2015).

La estomatitis subprotésica es una patología crónica que genera edema y eritema en la mucosa en contacto con la prótesis removible, por esta razón se asocia a pacientes portadores de prótesis, afectando particularmente a adultos mayores (Ercalik-Yalcinkaya & Özcan, 2015). En Chile según la última Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016-2017, los grupos etarios que presenta mayor prevalencia de uso de prótesis dental son en primer lugar el de 75 años y más, con un 40,7%, seguido del grupo de 65 a 74 años con un 29,6 % (MINSAL, 2019).

Clasificación y diagnóstico de estomatitis subprotésica

La estomatitis subprotésica se considera una patología multifactorial. Dentro de los factores etiológicos asociados se encuentran el uso de prótesis removible, bajo flujo salival, tabaco, polifarmacia, enfermedades que comprometen el sistema inmune e infección micótica, principalmente de *Candida*. Dentro de los factores relacionados con el uso de prótesis dental encontramos un ajuste inadecuado de la prótesis que genera

trauma e irritación en las mucosas, uso nocturno de prótesis y pobre higiene oral (Altarawneh et al., 2013; Figueiral et al., 2007; Gendreau & Loewy, 2011).

Es más común en adultos mayores, y aunque esto se debe en parte importante al uso de prótesis removible, no es la única causa ya que además suelen existir otros factores etiológicos concomitantes como polifarmacia, bajo flujo salival y compromiso del sistema inmune. Todo esto incentiva la proliferación de hongos tipo *Candida* (Hilgert et al., 2016).

Esta patología es mayoritariamente asintomática, aunque un pequeño porcentaje de pacientes experimenta dolor, picazón o sensación de ardor, sabor amargo y/o tendencia a sangrar en sitios afectados, diagnosticándose durante el examen intraoral (Gendreau & Loewy, 2011).

El diagnóstico de estomatitis subprotésica es esencialmente clínico, a través de un examen visual del área afectada y fue clasificada por Newton en 1962 según su severidad y características clínicas (Figura 1)(Ayuso-Montero R, Torrent-Collado J, 2004). En sus etapas iniciales se presenta como una placa blanquecina, la cual se desprende al raspado dejando una zona eritematosa bajo ella. Esta zona eritematosa suele ser la que se encuentra en contacto con la prótesis, asociándose principalmente a mucosa palatina, mas que a mucosas cubiertas por prótesis mandibulares . En estados más avanzados se puede encontrar una zona eritematosa más grande y/o incluso hiperplasia del tejido.



Figura 1. Clasificación de Newton y características clínicas según tipo de estomatitis subprotésica. a) Tipo I: Mucosa con área eritematosa localizada y puntiforme; b) Tipo II: Mucosa lisa y eritematosa con inflamación difusa y amplia en relación con área de contacto de la prótesis; c) Tipo III: Lesión inflamatoria crónica, con eritema generalizado e hiperplasia

(Imágenes obtenidas de Bengel & Bornstein, 2017; Velazquez et al., 2017; Caballero et al., 2002)

La confirmación diagnóstica se puede realizar mediante la obtención de una muestra de saliva estimulada, con la que se realiza un cultivo en agar Sabouraud dextrosa. Por otro lado, mediante frotis citológico se pueden observar la presencia de pseudohifas o hifas verdaderas a microscopía de luz de tal manera de confirmar la presencia de *C.albicans*.(Millsop & Fazel, 2016).

Existe una estrecha relación entre la presencia de la estomatitis subprotésica con el uso y estado de la prótesis del paciente. De hecho, entre los factores etiológicos relacionados con las prótesis removibles se encuentran la deficiente higiene oral, el uso nocturno de la prótesis, trauma por desajustes del aparato protésico y reacciones alérgicas a materiales dentales (Sakar et al., 2013). En este contexto, el estudio de cohorte realizado por Figueiral (2007) les asignó un rol traumático a todos los factores etiológicos relacionados con la prótesis, considerando entre ellos una oclusión inestable, uso nocturno y antigüedad de la prótesis. Estos los relaciona directamente con la proliferación de *C. albicans* y el desarrollo de estomatitis subprotésica, ya que entregan las condiciones ideales para la colonización de *Candida* (Figueiral et al., 2007).

Esta colonización ocurre tanto en la superficie de la prótesis, como en la mucosa oral que se encuentra en contacto con la prótesis, generando rápidamente un *biofilm* y acumulación de depósitos en ambas superficies. Los materiales dentales pueden contribuir al desarrollo de estomatitis, ya que al ser la superficie rugosa e hidrófoba favorece la unión de microorganismos y el desarrollo del *biofilm* (Gendreau & Loewy, 2011). De esta manera las prótesis actúan como un factor local que altera la relación hospedero- patógeno, mediando como reservorio y permitiendo el desarrollo de *Candida* como patógeno oportunista (Zomorodian et al., 2011). Al tomar muestras de pacientes portadores de prótesis removibles se encontraron levaduras del género *Candida* en pacientes con o sin signos clínicos de estomatitis, correspondiendo al 80% de los microorganismos recolectados (Zomorodian et al., 2011).

En Chile existen dos estudios publicados en el año 2013 donde se tomaron muestras de *Candida* de pacientes portadores de prótesis removibles con distintos niveles de estomatitis; estos arrojaron que el recuento de *Candida* aumenta en pacientes con

estomatitis subprotésica y, a medida que aumenta la gravedad pasando de tipo 1 a tipo 3, aumentaba la presencia de *Candida* tal como lo evidencia la tabla 1 y 2 (Gutiérrez et al., 2013; Lee et al., 2013).

Tabla 1. Distribución de severidad clínica de pacientes con estomatitis subprotésica (ESP) según la presencia y número de aislados de especie *Candida*.

| | Estomatitis Subprotésica | | | | | | Total | p=0,02 Chi ² |
|------------------|--------------------------|-------|-------------|-----|--------------|-------|-------|-------------------------|
| | ESP tipo I | | ESP tipo II | | ESP tipo III | | | |
| Cultivo negativo | 14 | 70% | 4 | 20% | 2 | 10% | 20 | |
| Cultivo positivo | 10 | 32,3% | 9 | 29% | 12 | 38,7% | 31 | |

(Obtenida de Gutiérrez et al., 2013)

Tabla 2. Recuento de UFC de levaduras del género *Candida*, en pacientes con y sin estomatitis subprotésica (ESP) según severidad.

| Tipo de recuento (UFC/ml) | Pacientes sin ESP (%) | Pacientes con ESP (%) | | |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| | (39.7) | ESPI (24.7) | ESPII (25.8) | ESPIII (9.7) |
| Alto (>100.001) | 5.5 | 4.4 | 4.2 | 11.1 |
| Mediano (1001- 100.000) | 13.5 | 56.6 | 50.0 | 77.8 |
| Bajo (0-1000) | 81.0 | 39.0 | 45.8 | 11.1 |

(Obtenida de Lee et al., 2013)

Levadura de género *Candida*

Los hongos del género *Candida* son levaduras ovaladas de tamaño pequeño con un diámetro que varía ente 2µm a 5µm y que se reproducen asexualmente por gemación. Estas levaduras forman colonias cremosas, brillantes y blanquecinas en el medio de cultivo adecuado. Este género se compone de más de 350 especies diferentes, de las cuales una minoría de ellas se han identificado como agentes infecciosos en humanos (Williams et al., 2011). Sin embargo, más del 90% de las infecciones en humanos están relacionadas solo con cinco especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Abaci et al., 2010; López & Marín, 2001; Pappas et al., 2018).

Todas las especies del género *Candida* son capaces de sufrir cambios morfológicos de levaduras a pseudohifas o hifas verdaderas, proceso que se conoce como morfogénesis (López & Marín, 2001). Las levaduras corresponden a la forma planctónica de *Candida*. Se reconocen porque son ovaladas y se asocian a su forma comensal. Para cambiar morfológicamente a pseudohifas, la yema hija se alarga para posteriormente formar un septo y constricciones. Finalmente se forman las hifas verdaderas que tienen un tubo germinal más largo y estrecho, además no se ven tantas constricciones, pero si se evidencia la presencia de septos (Figura 2) (Abaci et al., 2010; Sudbery, 2011).

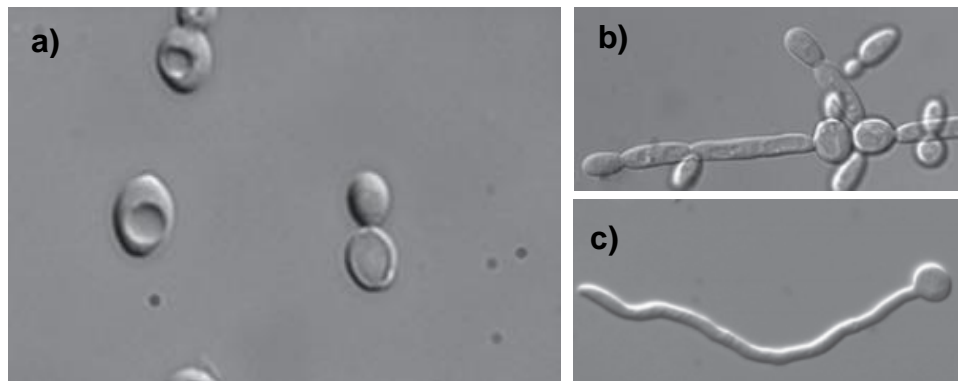


Figura 2. Cambios morfológicos de *C. albicans*. a) levadura, b) pseudohifas, c) hifa verdadera (Obtenida de Sudbery,2011)

Dentro del género *Candida* la especie *C. albicans* es la más estudiada y frecuente en infecciones orales, representando más del 80% en aislados clínicos. Por otro lado, *Candida glabrata* ha aumentado significativamente en la última década, siendo una preocupación creciente ya que se ha llegado a relacionar en un 15% en infecciones sistémicas (Hu et al., 2019).

Las levaduras del género *Candida* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son comensales habituales del microbioma normal de los humanos, encontrándose en cavidad oral, piel, mucosa vulvo vaginal y sistema digestivo. Más del 60% de los aislados clínicos en la cavidad oral se identifican como *C. albicans* a diferencia de las especies no *albicans* las cuales se encuentran en un 8-10% de los aislados (Braunsdorf & Leibundgut-Landmann, 2018; Sadeghi et al., 2018).

Un estudio realizado por Gutiérrez (2013), donde se aislaron cepas de *Candida* de muestras obtenidas de mucosas y prótesis de pacientes con estomatitis subprotésica, se encontró en un 73% *C. albicans*, demostrando el predominio de esta especie en la patología (Figura 3) (Gutiérrez et al., 2013).

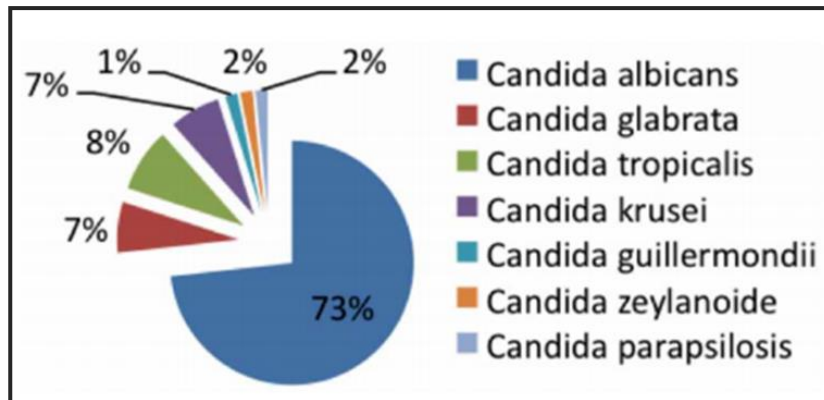


Figura 3. Distribución de especies del género *Candida* aisladas tanto de prótesis como de paladar de pacientes con estomatitis subprotésica (Obtenida de Gutiérrez et al., 2013)

La especie *C. albicans* suele encontrarse de forma habitual en la cavidad oral, pero su proliferación es más prevalente en pacientes portadores de prótesis, fumadores, pacientes con enfermedades crónicas asociadas, ingesta de medicamentos y bajo flujo salival (Lynge Pedersen et al., 2015).

Las características morfológicas y metabólicas de *C. albicans* son consideradas sus principales factores de patogenicidad, como la adhesión a superficies, secreción de enzimas hidrolíticas y la formación de hifas y pseudohifas, las cuales están asociadas además a la capacidad de formar *biofilms* (Williams et al., 2011). En los últimos años se ha centrado el interés en la posible asociación de candidiasis oral con trastornos potencialmente malignos de la mucosa oral, la evidencia sugiere que podría ser un factor predisponente (Hu et al., 2019).

Características y desarrollo de *biofilm* de *Candida albicans*

Los *biofilms* son comunidades biológicas altamente organizadas, las cuales se adhieren con alta afinidad a una superficie abiótica (dispositivos médicos como: catéteres, válvulas cardíacas, reemplazos de articulaciones, prótesis dentales) o biológica (mucosas, uñas, piel, etc.). Los microorganismos que se encuentran en este tipo de complejos biológicos suelen presentar menores tasa de crecimiento y mayor resistencia a tratamientos, por lo que se vinculan a infecciones persistentes, dificultando su erradicación (Cavalheiro & Teixeira, 2018).

Si bien la mayoría de las especies de *Candida* pueden generar *biofilms*, presentan diferencias en cuanto a su morfología y características de la matriz extracelular (MEC). *C. albicans* además de ser la mayor responsable de infecciones por *Candida* tiene la capacidad de formar *biofilms* heterogéneos en cuanto a morfología y con una MEC de polisacáridos muy resistente y especializada, cuya estructura le da mayor resistencia a lesiones químicas y físicas, siendo muy difícil combatir en entornos clínicos (Cavalheiro & Teixeira, 2018; Fox & Nobile, 2013; Hall-Stoodley et al., 2004).

La resistencia de los *biofilms* a antifúngicos convencionales es multifactorial, ya que no sólo se genera una protección física contra las defensas inmunes del huésped y medicamentos, sino que las células del *biofilm* son intrínsecamente resistentes a fármacos debido a su regulación positiva constituida por bombas de flujo (Gulati & Nobile, 2016).

La formación de *biofilms* es un proceso muy bien descrito para *C. albicans* que se divide generalmente en 4 etapas (figura 4):

- I. Etapa de adhesión: Células en su forma planctónica de levadura se adhieren a una superficie, formando una capa basal la cual cumple la función de anclaje.
- II. Etapa de Iniciación o Proliferación: Se continúan uniendo capas celulares, las cuales además de proliferar cambian morfológicamente a su forma de pseudohifas e hifas verdaderas, las cuales forman un andamio que proporciona integridad estructural al *biofilms*.

- III. Etapa de Maduración: Se forma una densa matriz extracelular alrededor de las células la cual es una barrera física protectora fundamental del *biofilms*.
- IV. Etapa de Dispersión: En esta etapa se propagan células en forma de levadura a otros sitios. Este proceso ocurre casi en conjunto con la etapa de Maduración, razón por la cual algunos autores los juntan en un único proceso (Cavalheiro & Teixeira, 2018; Gulati & Nobile, 2016; Matthew B. Lohse et al., 2018; Nobile & Johnson, 2015).

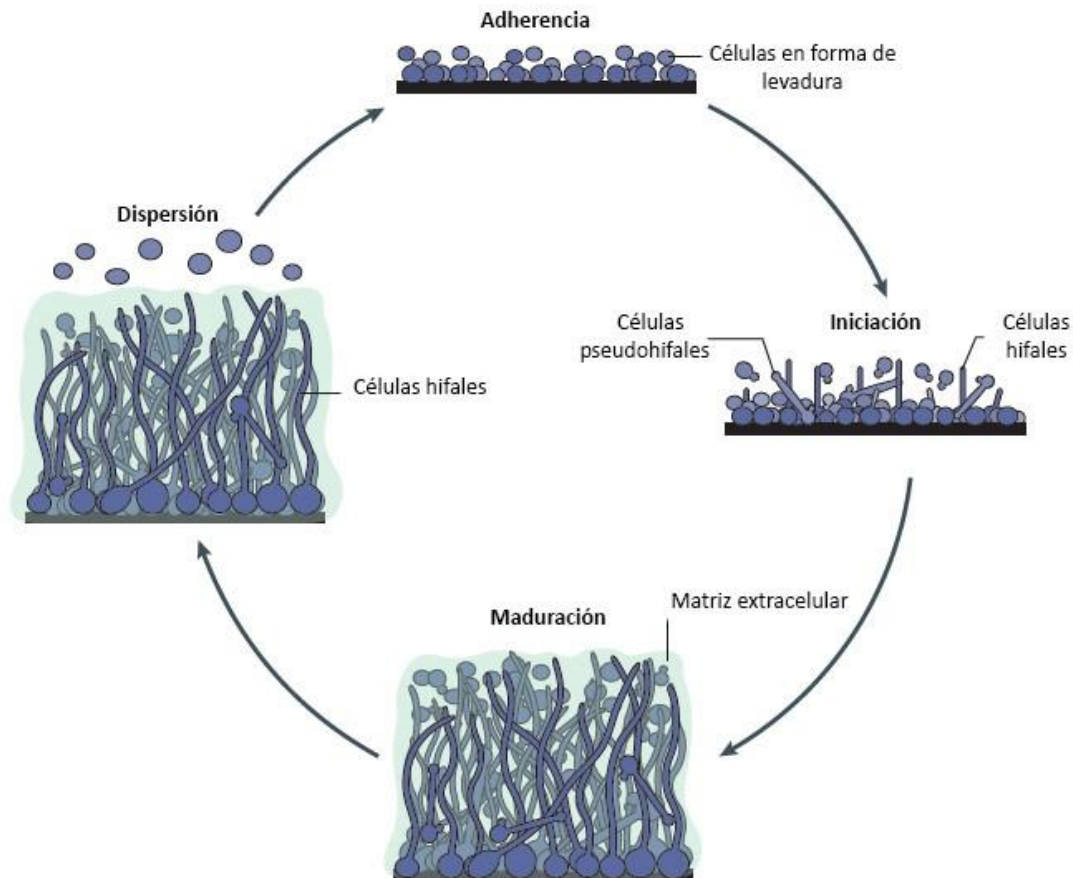


Figura 4. Formación de *biofilms* de *Candida albicans*. La formación de *biofilms* de *C. albicans* se ha dividido en cuatro etapas: adherencia, iniciación, maduración y dispersión (Adaptada de Lohse et al., 2018)

Mecanismo de resistencia de *biofilms*

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas para el tratamiento de infecciones asociadas a la formación de *biofilms* es su alta resistencia a los

antifúngicos clásicos. Este fenómeno se debe principalmente a cuatro mecanismos (figura 5):

1. Aumento de expresión de bombas de eflujo: transportadores encargados de remover diversas moléculas desde el medio interno de la célula, entre ellos antifúngicos. *C. albicans* tiene principalmente 2 tipos de bombas de eflujo, las facilitadoras principales y las de casete con unión de ATP (ABC o ATP *Binding Casette*). En presencia de antifúngicos convencionales se ha evidenciado la regulación positiva de los genes que codifican las bombas de eflujo (Cdr1, Cdr2 o Mdr), o en reguladores transcripcionales que controlan su expresión. Por esto se cree que esta mayor expresión génica genera una sobreexpresión de bombas de eflujo (M.B. Lohse et al., 2018).

La sobreexpresión de las bombas de eflujo son la causa más frecuente de resistencia a antifúngicos, se ha propuesto que esta sobreexpresión se debe al llamado “*quorum sensing*” y a una respuesta adaptativa a señales de estrés (Pozo & Del Cantón, 2016).

El mecanismo conocido como *quorum sensing* es la vía de comunicación polimicrobiana, basada en pequeñas moléculas excretadas las cuales desencadenan una respuesta celular adaptativa. Esta comunicación le permite pensar y reconocer cambios ante los cuales necesite adaptarse, por ejemplo, la presencia de fármaco (Deveau & Hogan, 2011; Díaz Caballero et al., 2011; Pereira-Cenci et al., 2008).

2. Matriz extracelular: Contribuye a las características estructurales del *biofilm* y actúa como barrera física. Se ha demostrado que el 1,3- β - glucano, uno de los componentes mayoritarios de la matriz extracelular, tiene la capacidad de unirse y secuestrar a diferentes antifúngicos evitando que estos lleguen a las células de la biopelícula. Se ha visto que, además de contribuir a la solidez estructural del *biofilm*, la presencia de ADN complementario (ADNc) y polisacáridos podría aumentar la resistencia a antifúngicos (Matthew B. Lohse et al., 2018; Nett et al., 2010).

3. Células persistentes: Durante el crecimiento planctónico persisten células que se desarrollan estocásticamente por un mecanismo desconocido que se caracterizan por tener una actividad metabólica disminuida, lo que les otorga resistencia a los fármacos que actúan sobre procesos que requieren una alta actividad metabólica (ej: síntesis de membrana, etc.). Estas células pueden volver a convertirse en células metabólicamente activa y contribuir a la reformación de la biopelícula o recolonización de otra superficie (Lewis, 2010; Lohse et al., 2018).

4. Mayor densidad celular, aumento de la respuesta al estrés y disminución de la tasa metabólica: El *biofilm* maduro de *C. albicans* presenta varias capas con células de *C. albicans* morfológicamente distintas (levadura, hifas y pseudohifas). Esta heterogeneidad genera distintos microambientes, como nichos hipóxicos en las zonas más internas y nichos aeróbicos en la superficie, lo que produce aumento en la resistencia a antifúngicos. Además, disminuye la tasa metabólica lo que disminuye los blancos farmacológicos de los antifúngicos convencionales (Lohse et al., 2018).

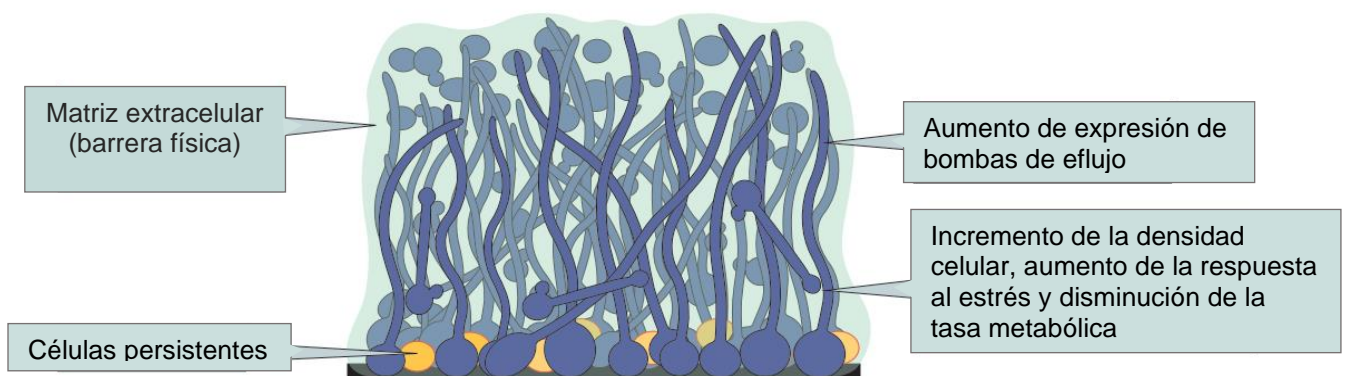


Figura 5. Mecanismos de resistencia en *biofilms* de *C. albicans* (Adaptado de Lohse y cols., 2018)

Los *biofilms* se forman fácilmente en las superficies de prótesis, donde su uso modifica el microambiente en la cavidad oral, dificultando la llegada de anticuerpos provenientes de la saliva, determinando la aparición de un medio ácido y anaerobio, favoreciendo la

proliferación y adhesión de *Candida* (Brevis azocar et al., 2008). Al respecto, un estudio realizado por Garaicoa y colaboradores (2018), sugiere que los adhesivos para prótesis dentales pueden inactivar la actividad de la respuesta inmune innata en la cavidad oral, incentivando el crecimiento de *C. albicans* y con esto la aparición de estomatitis subprotésica. Por lo que agregar antimicóticos a los adhesivos para prótesis podría ayudar en el tratamiento inhibiendo el crecimiento de *C. albicans* (Garaicoa et al., 2018).

Si bien la estomatitis subprotésica es multifactorial, hay varios factores etiológicos relacionados con el uso de prótesis, como lo son el desajuste y consecuente trauma de mucosas en contacto con la prótesis, porosidad de materiales de confección de prótesis, generando un ambiente propicio para la formación de un *biofilm* (Figura 6) de *C. albicans* (Gendreau & Loewy, 2011).

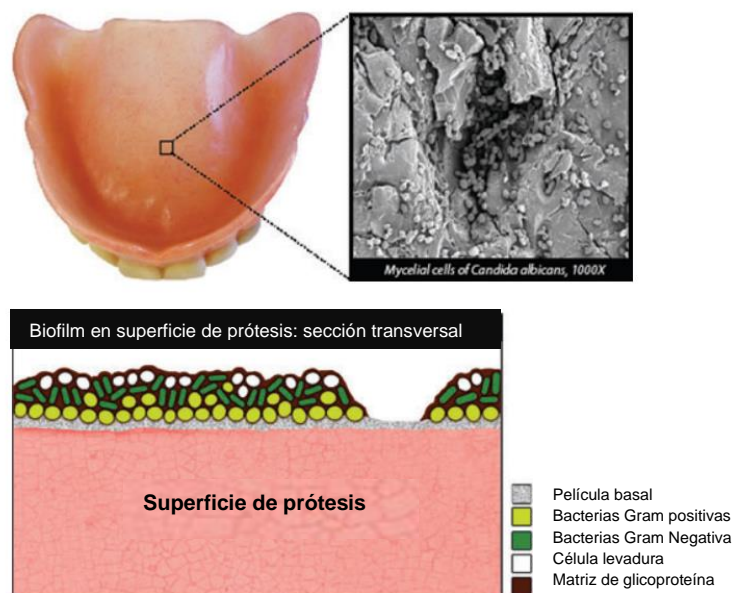


Figura 6. Representación microscópica de la adhesión de células de *Candida albicans* en la superficie de prótesis (Obtenida de Gendreau & Loewy, 2011)

Las prótesis dentales generalmente están fabricadas con polimetacrilato, material que retiene placa bacteriana debido a su porosidad y aspereza, características superficiales que pueden contribuir a la adherencia y proliferación de microorganismos. Variados estudios han demostrado la colonización de *C. albicans* sobre superficies protésicas y el

cambio morfológico de levaduras a hifas sugiriendo la formación de *biofilm* sobre la base protésica (Bizarro & Goes, 2006; Velazco et al., 2009). Entre estos se encuentra el estudio de Avon publicado el 2007, que demostró la presencia de *biofilms* de *C. albicans* sobre prótesis dentales, en ausencia y presencia de estomatitis a los pocos días de uso (Figura 7) (Avon et al., 2007).

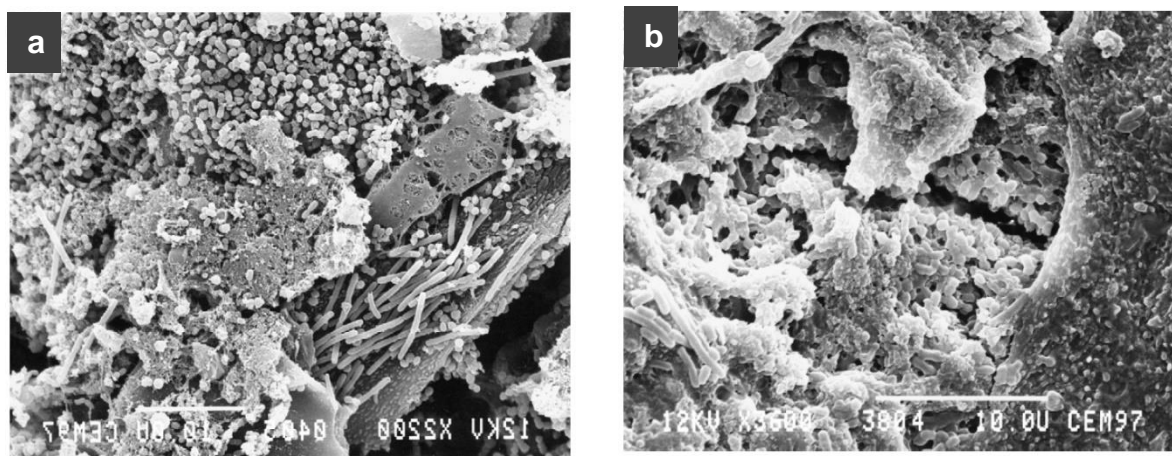


Figura 7. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de biopelículas de prótesis dentales. a) Biopelícula presente en la prótesis de un paciente sano a los 2 días de uso. b) Imagen con aumento mayor de prótesis de paciente con estomatitis subprotésica a los 2 días de uso. (Obtenida de Avon et al., 2007)

Tratamiento de estomatitis subprotésica

En cuanto al tratamiento para estomatitis subprotésica, actualmente existen diferentes opciones. Su elección depende del tipo de estomatitis que presenta el paciente según la clasificación de Newton por severidad, además de la presencia de desajustes de la prótesis. Se han empleado diversos métodos para el tratamiento de estomatitis, esto incluyen elementos mecánicos utilizados directamente en la prótesis y antimicóticos de uso tópico o sistémico en casos más severos (Hilgert et al., 2016; Williams et al., 2011).

Las pautas de tratamiento en la etapa inicial de la patología vigilan y tratan el desajuste de la prótesis realizando en primera instancia rebasados protésicos y uso de acondicionadores de tejidos. A medida que aumenta la severidad de la patología se

aplican otras estrategias como la utilización de antifúngicos tópicos en conjunto con acondicionadores de tejido o en gel (ver tabla 3). En etapas severas y pacientes refractarios a estrategias de control iniciales, se utilizan antifúngicos sistémicos, ya que puede haber una diseminación de *Candida* a otros sitios, pudiendo generar una infección micótica más difícil de manejar (Caballero et al., 2002; Hilgert et al., 2016; Skupien et al., 2013).

La educación de pacientes portadores de prótesis es un factor muy importante para el éxito del tratamiento, siendo la instrucción de higiene clave para evitar la aparición de candidiasis oral (MINSAL, 2010; Otero E et al., 2015). Estudios con pacientes susceptibles al desarrollo de estomatitis subprotésica, demostraron una disminución significativa en la incidencia de estomatitis cuando se realizaba instrucción de higiene oral, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre el uso de enjuagues antimicrobianos, demostrando la importancia de que el paciente maneje una buena técnica de higiene oral. Por otro lado, en casos avanzados de estomatitis subprotésica se debe complementar con el uso de antifúngicos para así evitar recidiva, siendo un tratamiento más efectivo en estos casos (Lam et al., 2012).

Además de la educación al paciente, es importante corroborar el estado de la prótesis parcial removible que cumpla con las condiciones de soporte, estabilidad y retención. En casos de que estas se vean alteradas, se puede recurrir al uso de rebasados duros o blandos, también llamados acondicionadores de tejidos (Rodríguez et al., 2002).

En pacientes inmunocomprometidos o con patologías sistémicas de base es de suma importancia manejar los factores asociados a un mayor riesgo de estomatitis, ya que *Candida* es la cuarta causa principal de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes hospitalizados. Además, los aislados obtenidos de estos pacientes suelen relacionarse a cepas resistentes a antifúngicos comúnmente utilizados como Fluconazol. En cuanto al uso de sustitutos salivales en pacientes con xerostomía hay controversia ya que se sugiere que pueden reducir la prevalencia de *Candida*, sin embargo, diferentes estudios demuestran que no son eficaces, por el contrario dependiendo de su composición pueden aumentar el riesgo de candidiasis (Lam et al., 2012; Millsop & Fazel, 2016).

| Inmersión de prótesis en agentes desinfectantes | Antifúngicos tópicos | Antifúngicos sistémicos |
|--|--|---|
| Hipoclorito 5% | Nistatina pomada o enjuagues 3 veces al día durante 14 días | Fluconazol 50-200mg/día durante 7-14 días |
| Clorhexidina 0,12% - 0,2% | Ketoconazol al 2%, 3 veces al día durante 14- 28 días | Ketoconazol 200mg/día durante 14 días |
| Bicarbonato sódico al 20% | Anfotericina B crema 3-4 veces al día durante 14 días máx (no disponible en Chile para uso tópico) | Itraconazol 100-200mg/día durante 14 días |
| Irradiación por microondas | Miconazol gel o crema al 2% (3 veces al día durante 14 días) | |

Tabla 3. Pautas de tratamiento de estomatitis subprotésica

(Adaptada de Hilgert et al., 2016; MINSAL 2010 y García- Cuesta y cols., 2014; Millsop & Fazel, 2016)

En cuanto al uso de acondicionadores de tejidos (ADT), estos corresponden a materiales de rebasado de corta duración a base de polimetacrilato, los cuales forman un gel que se comporta como material viscoelástico, funcionando como una almohadilla dando alivio a tejido irritado o lesionado. Los ADT suelen ser el mecanismo de tratamiento más utilizado para estomatitis subprotésica (Bonilla R. et al., 2012; Hong et al., 2010). El principal inconveniente de este material es su poca estabilidad en el medio oral, ya que presenta cambios en sus propiedades mecánicas, física y biológicas. Estos cambios causan un aumento en la dureza y porosidad del material, creando irregularidades en su

superficie ocasionando irritación en mucosa de soporte además de un ambiente ideal para la colonización de *C.albicans* (Pereira-Cenci et al., 2008).

Diversos estudios indican que los ADT favorecen la colonización de *Candida spp.* sobre y dentro del material, ya que a medida que pasan los días se van tornando duros y ásperos, observándose grietas, depresiones e irregularidades. Es por esto que se deben sustituir entre sesiones clínicas de no más de una semana (Bonilla R. et al., 2012; Kang et al., 2013; Pereira-Cenci et al., 2008).

En relación al uso de antifúngicos no hay evidencia de que una terapia sea mejor que otra. Pero por otro lado, el fluconazol es el fármaco que se prescribe con mayor frecuencia (46,3%) en cepas resistentes a otros tratamientos (Won et al., 2015).

Sin embargo, el estudio realizado por Figueiral el año 2015 evaluó el efecto del tratamiento estándar con fluconazol por 15 días en el desarrollo clínico de pacientes con estomatitis subprotésica. Si bien el tratamiento con fluconazol redujo significativamente la colonización de *C. albicans* y mejoró su severidad, estos efectos se observaron solo inmediatamente después del tratamiento. Luego de un seguimiento de 6 meses la colonización de *C. albicans* y la gravedad de la estomatitis fueron similares a los observados antes del tratamiento. Más aún, luego de los 6 meses, aumentó la presencia de aislados clínicos resistentes a fluconazol. Esto revela que es eficiente el tratamiento a corto plazo, pero no evita recidiva de la patología (Figueiral et al., 2015)

Si bien existe una amplia variedad de tratamiento para la estomatitis subprotésica, al revisar la literatura se observa que la elección depende del tipo de estomatitis, características del paciente y práctica clínica del odontólogo. Aunque la nistatina y miconazol son ampliamente utilizados vía tópica, el fluconazol sigue siendo el fármaco de elección como tratamiento sistémico en pacientes con diseminación de la infección o cepas altamente resistentes a otros tratamientos. Como se mencionó anteriormente, la respuesta clínica en general es muy buena con los tratamientos farmacológicos clásicos y la mayoría de las cepas aisladas son susceptibles a los antifúngicos convencionales como fluconazol. En este contexto entonces, es válido preguntarse ¿cómo se puede explicar que la respuesta al tratamiento sea insuficiente y que además los pacientes

sufren de recidiva a pesar de un tratamiento antifúngico? Esto puede deberse en parte a que la gran mayoría de los estudios que evalúan la susceptibilidad de *C. albicans* obtenidos de pacientes con estomatitis protésica y también otros tipos de candidiasis oral, realizan ensayos sobre las levaduras aisladas en su estado planctónicos. Debido a que la colonización de mucosas orales y prótesis removibles implica la adhesión y formación de *biofilms*, en este trabajo evaluamos la susceptibilidad a fluconazol en una serie de aislados clínicos obtenidos de pacientes con estomatitis protésica tanto en su forma planctónica como en *biofilms*.

3. HIPÓTESIS

Las cepas de levadura de *Candida albicans* aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica de la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile, son más resistentes a fluconazol en su forma de *biofilms* en comparación con su forma planctónica.

4. OBJETIVOS

I. Objetivo General

Comparar la susceptibilidad a fluconazol en distintas cepas clínicas de pacientes con estomatitis protésica de la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile de *Candida albicans* en su forma planctónica y en *biofilms*.

II. Objetivos específicos

1. Determinar la CIM de cepas clínicas de levaduras *Candida albicans* en su forma planctónica.
2. Determinar la IC50 de cepas clínicas de levadura *Candida albicans* en *biofilms*.
3. Caracterizar la susceptibilidad a fluconazol de las cepas clínicas de levaduras del género *Candida albicans* en su forma planctónica y en *biofilms*, clasificando las cepas en sensibles y resistentes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

El estudio fue de tipo experimental *in vitro*, y se encuentra adscrito al proyecto PRI-ODO 2020/001.

Cepas clínicas de *Candida albicans*

Las cepas fueron donadas gentilmente por la Dra. Ximena Lee (Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile) y la Profesora Leyla Gómez (Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile) (Lee Muñoz et al., 2015). Estos aislados corresponden a 18 cepas que fueron obtenidas de pacientes con estomatitis protésica. El código de las cepas clínicas y tipo de estomatitis de la cual se obtuvieron se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Cepas de *Candida albicans*

| Cepa | Tipo de estomatitis | Cepa | Tipo de estomatitis |
|------|---------------------|------|---------------------|
| 3P | Tipo I | 31R | Tipo III |
| 3R | Tipo I | 32P | Tipo II |
| 7R | Tipo I | 33R | Tipo II |
| 17P | Tipo I | 35R | Tipo I |
| 18R | Tipo I | 39P | Tipo II |
| 22R | Tipo II | 39R | Tipo II |
| 24R | Tipo III | 42P | Tipo I |
| 29P | Tipo II | 50R | Tipo II |
| 31P | Tipo III | 58R | Tipo II |

Tipos de estomatitis subprotésica diagnosticada en pacientes de cepas clínicas utilizadas. Tipo I: 7 cepas, tipo II: 8 cepas, tipo III: 3 cepas.

Pre- inóculo para ensayos de susceptibilidad

Para la realización de los ensayos de susceptibilidad del objetivo 1 y 2, primero se cultivaron cepas de *C. albicans* ya identificadas en placas de agar Sabouraud dextrosa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas para así obtener colonias aisladas de *C. albicans* viables y

puras (1-2 mm). El preinóculo se preparó resuspendiendo una de estas colonias de *C. albicans* en RPMI 1640 y se incubó a 28°C durante 24 horas para obtener células planctónicas en su estado levaduriforme. Al cabo de este periodo, las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron contabilizadas y ajustadas a 1×10^5 UFC/ml mediante conteo en cámara de Neubauer. Este preinóculo se utilizó en ambos ensayos de susceptibilidad para cada cepa estudiada.

Fluconazol

El fármaco utilizado en ambos ensayos de microdilución fue fluconazol (Sigma). Este se preparó mediante su dilución en DMSO y RPMI 1640 ajustando la concentración inicial de la solución stock a 128 mg/L. Después se realizaron diluciones seriadas en concentraciones decrecientes desde 64 mg/L hasta 0,125 mg/L en DMSO y RPMI 1640 a partir de la solución stock inicial, según lo indicado en el método de ensayos de microdilución para la determinación de CIM de agentes antifúngicos, realizado por el Comité Europeo de Testeo de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST) (Tabla 5) (EUCAST, 2020; Rodríguez-Tudela, 2008).

Tabla 5. Rangos de concentraciones de trabajo para diferentes agentes antifúngicos

| <i>Candida albicans</i> | |
|-------------------------|---------------------------------|
| Agente antifúngico | Rango de concentraciones (mg/L) |
| Anfotericina B | 0,0312-16 |
| Fluconazol | 0,125-64 |
| Itraconazol | 0,0156-8 |
| Caspofungina | 0,0312-16 |

(Adaptado de EUCAST, 2020)

En cada placa de 96 pocillos de fondo plano estéril, se sembraron 100µL de inóculo previamente ajustado a 1×10^5 UFC/ml de las cepas en triplicado para cada condición experimental. En la primera columna, al igual que en todos los pocillos del borde externo,

se adicionaron 200 μ L de RPMI como blanco. En la segunda columna, como control negativo, se incubaron células con medio RPMI estéril sin tratamiento (100 μ L de RPMI + 100 μ L de inóculo). Luego desde la tercera columna hasta la penúltima se adicionaron 100 μ L de cada cepa + 100 μ L de fluconazol en concentraciones decrecientes (Figura 8). Este esquema de siembra se utilizó para los ensayos de ambos objetivos.

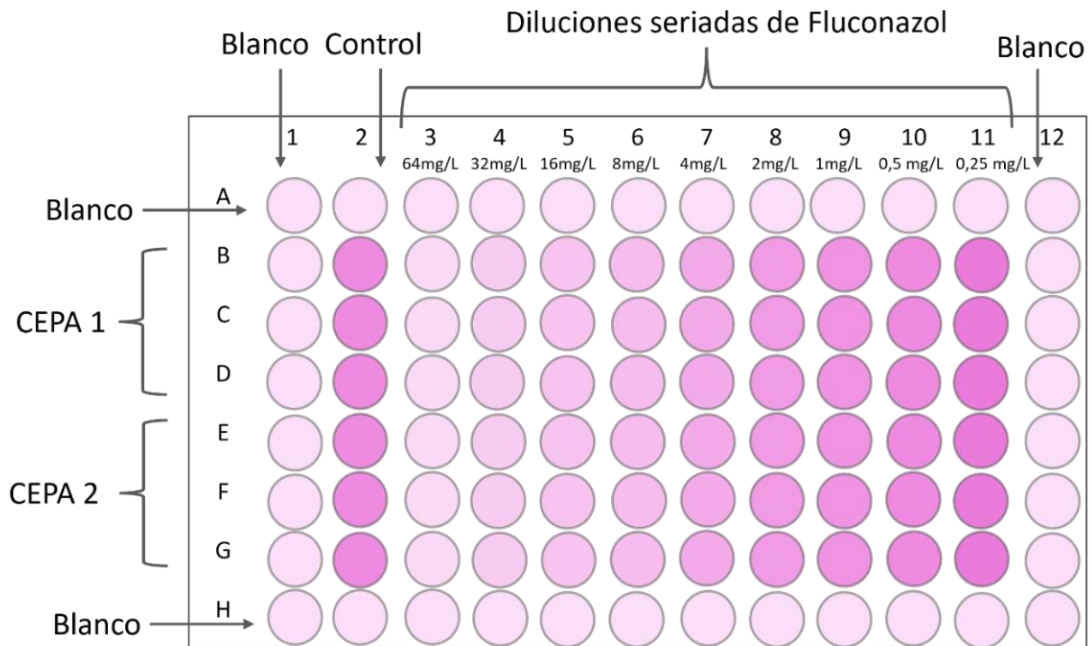


Figura 8. Esquema de siembra de placa de 96 pocillos en ensayos de microdilución Donde blanco: 200 μ L de RPMI, control: 100 μ L de RPMI + 100 μ L de inóculo

Objetivo específico 1. Determinación de CIM en células planctónicas de *Candida albicans*

Mediante ensayos de microdilución, según lo expuesto anteriormente, se obtuvo la curva concentración respuesta para fluconazol. Esta curva nos entregó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada cepa clínica estudiada. Para realizar este ensayo se adicionaron 100µl de una suspensión estandarizada (1×10^5 UFC/mL) en RPMI- 1640 a cada uno de los pocillos en placas de microdilución de 96 pocillos. Posteriormente se añadieron 100µl de distintas diluciones de fluconazol en RPMI para obtener las concentraciones finales descritas para cada condición (Figura 8). Las placas se incubaron sin agitación a 36 ± 1 °C en aire ambiente durante 24 h. Luego de este periodo, se determinó mediante ensayo de reducción de 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5- sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2H-tetrazol hidróxido) (XTT) la viabilidad celular. En breve, se descartó el sobrenadante y se agregaron a cada pocillo 100µl de solución XTT/menadiona. Luego se cubrió la placa con papel de aluminio y se incubó en oscuridad durante 2 h a 37°C. Finalmente se determinó la absorbancia en un lector de microplacas Infinite F50 (Tecan®) a 450 nm.

Objetivo específico 2. Determinación de IC₅₀ en *biofilms* de *Candida albicans*

De acuerdo a nuestras condiciones experimentales definimos para los *biofilms* como la concentración capaz de inhibir en un 50% la viabilidad celular de cada cepa (IC₅₀) (EUCAST, 2020; Rodriguez-Tudela, 2008).

Para determinar el IC₅₀ en *biofilms* de *C. albicans* se cultivaron 100 µl de una suspensión estandarizada 1×10^5 UFC/mL en cada pocillo en placas estériles de 96 pocillos de fondo plano, con 100µl de RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% de tal manera de favorecer la filamentación y adhesión a las placas. Posteriormente se incubó a 37°C sin agitación durante 24 h. Transcurrido este tiempo se descartó el sobrenadante y se lavaron los *biofilms* formados tres veces con PBS estéril, para remover células planctónicas no adheridas. Luego se añadieron 100 µl de las distintas diluciones de fluconazol en RPMI a lo largo de la ordenada para obtener las concentraciones finales previamente descritas (Tabla 5). Estas placas se incubaron sin agitación a 37°C en aire

ambiente durante 24 h.

Al cabo de este periodo de incubación se determinó la viabilidad de las células adheridas a través del método de reducción de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para esto primero se sacó el sobrenadante de todos los pocillos de la placa de 96 pocillos, después se agregaron 100µl de solución MTT a cada pocillo. Estas placas se incubaron durante 2 h a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ sin agitación. Transcurrido este tiempo se retiró el MTT de todos los pocillos, para agregar 40µl de DMSO en cada pocillo e incubar con agitación durante 15 min a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de microplacas Infinite F50 (Tecan®) a 570 nm.

Objetivo específico 3. Caracterizar la susceptibilidad a fluconazol de las cepas clínicas de levaduras del género *Candida albicans* en su forma planctónica y en *biofilms*, clasificando las cepas en sensibles y resistentes.

Teniendo las curvas de CIM de Fluconazol, se utilizó este parámetro farmacodinámico como referencia para poder clasificar cada cepa estudiada en susceptible o resistente tanto en células planctónicas como en *biofilms*. Bajo las condiciones experimentales, el valor de la CIM corresponde a la concentración que inhibe el 50% del crecimiento de especies del género *C. albicans* (IC_{50}). Este parámetro permitió clasificar cada cepa en susceptible o resistente al fluconazol según los valores informados por EUCAST para métodos de microdilución (Tabla 6) (EUCAST, 2020; Rodríguez-Tudela, 2008).

Los puntos de corte de EUCAST se utilizan para clasificar los resultados en tres categorías de susceptibilidad:

- Susceptible (S): alta probabilidad de éxito terapéutico con un régimen de dosificación del agente en dosis estándar.
- Intermedia (I): alta probabilidad de éxito terapéutico porque la exposición al agente antifúngico aumenta por un incremento de la dosis estándar.
- Resistente (R): alta probabilidad de fracaso terapéutico incluso cuando hay una mayor exposición. (EUCAST, 2020; Rodríguez-Tudela, 2008)

Para simplificar las tablas, no se incluye la categoría I, se interpreta como los valores entre los puntos de corte S y R

Tabla 6. Clasificación de susceptibilidad para *Candida albicans*. Puntos de corte clínico para agentes antifúngicos determinados durante el período 2007-2019, versión 10.0.

| | Puntos de corte MIC (mg/L) | |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | <i>Candida albicans</i> | |
| | Susceptible (S) ≤ | Resistente (R) > |
| Anfotericina B | 1 | 1 |
| Caspofungina | NE | NE |
| Fluconazol | 2 | 4 |
| Itraconazol | 0,06 | 0,06 |

NE: No establecido aún por su gran variación en los rangos de MIC

(Adaptado de EUCAST, 2020)

Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces por triplicado.

Los valores de absorbancia fueron procesados en Excel obteniendo el porcentaje de crecimiento de las diferentes cepas estudiadas a distintas concentraciones de Fluconazol. Estos datos procesados fueron finamente analizados y graficados utilizando el software GraphPad Prism v6.0®.

6. RESULTADOS

Objetivo específico 1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas clínicas de *Cándida albicans* a Fluconazol en células planctónicas.

Primero se determinó la susceptibilidad en la especie de referencia del género *Candida* ATCC 90029, la cual ha sido informada como *C. albicans* sensible a fluconazol, mediante el método de microdilución para testeo *in vitro* de antifúngicos informado por EUCAST. El mismo utilizado y descrito en métodos para el objetivo específico 1.

La curva dosis respuesta de la cepa ATCC 90029 (figura 9) parte sobre el 100% de crecimiento para caer drásticamente después de lograr un 50% de inhibición y llegar a un 0% de crecimiento celular. Este comportamiento es compatible con cepas susceptibles al fármaco estudiado, lo cual concuerda con la clasificación de esta cepa.

Esto nos permitió estandarizar la técnica, para determinar la susceptibilidad a fluconazol de cepas clínicas.

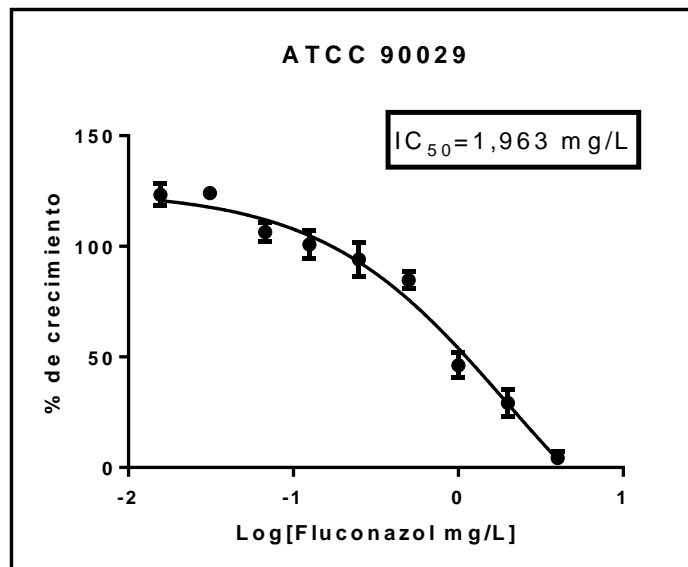
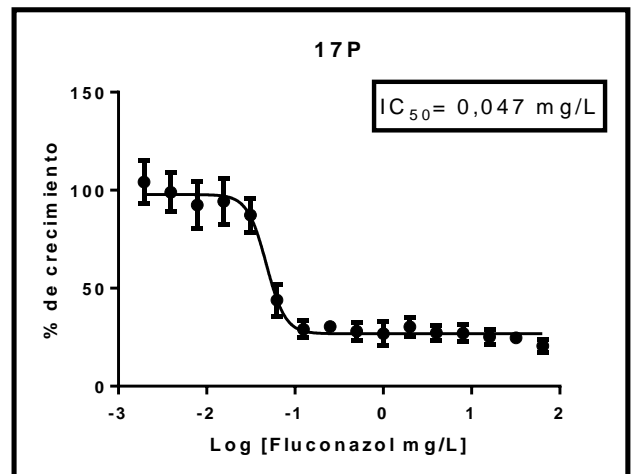
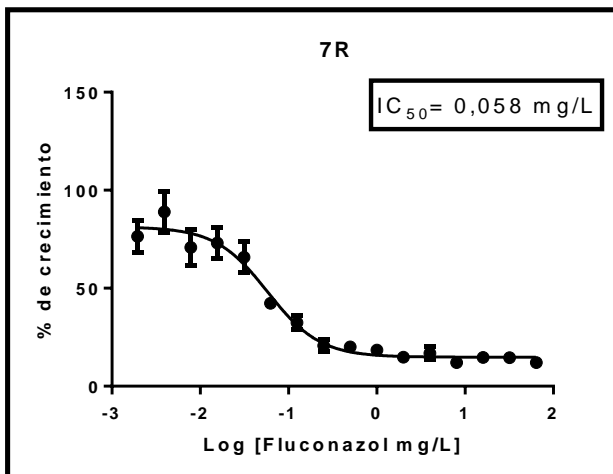
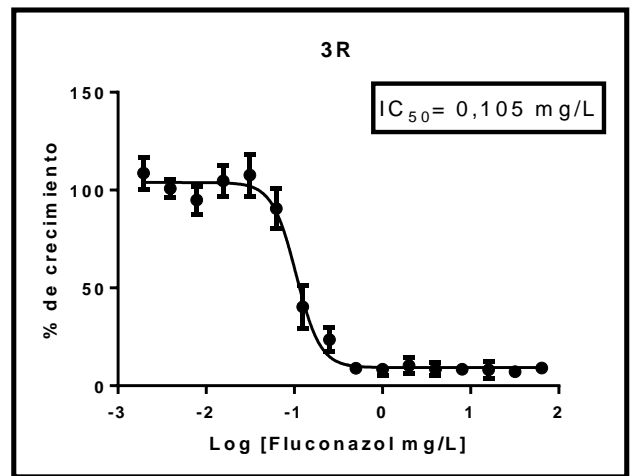
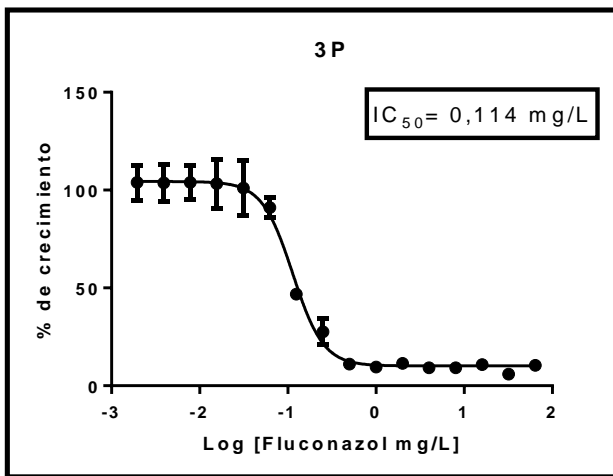
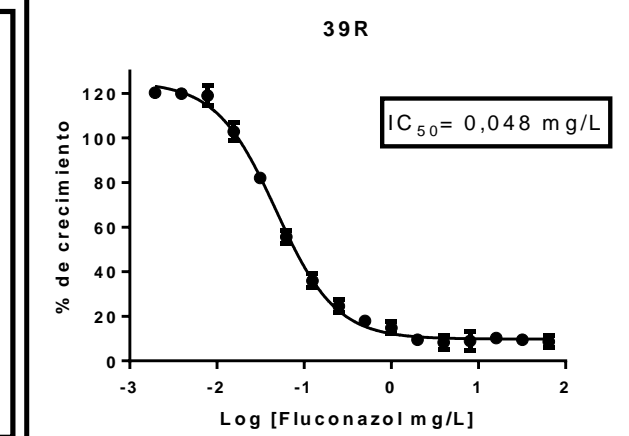
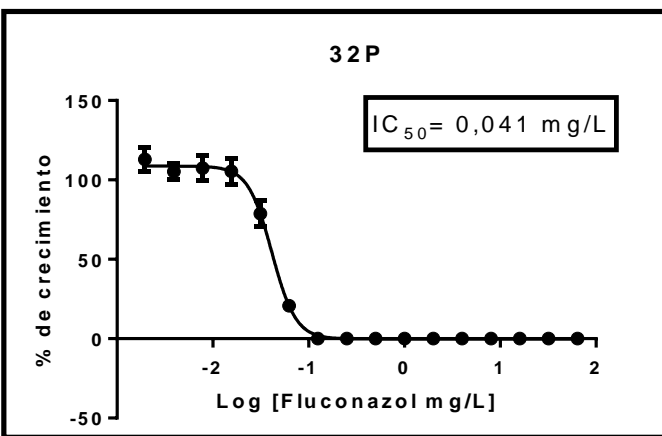
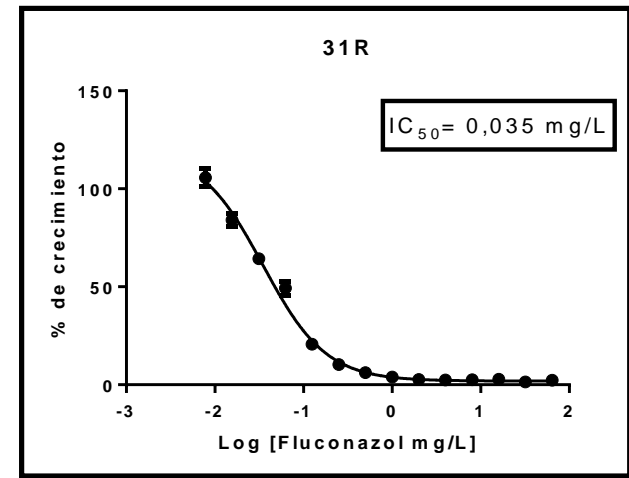
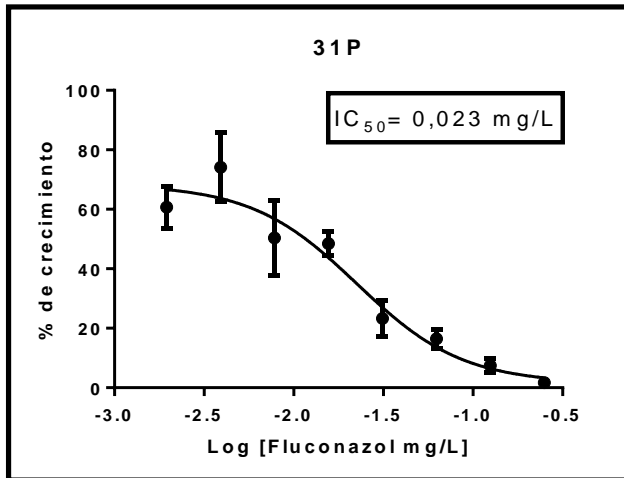
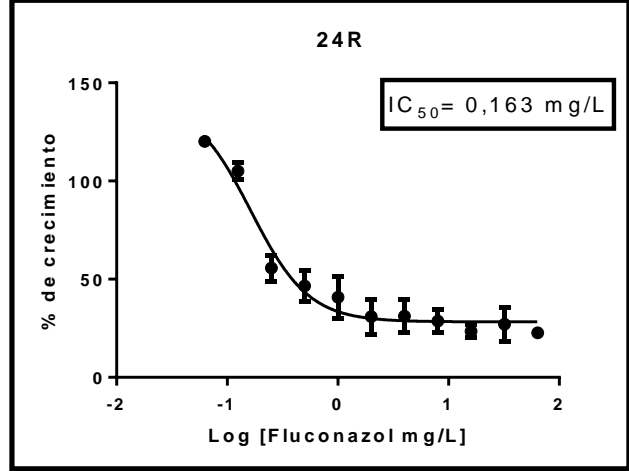
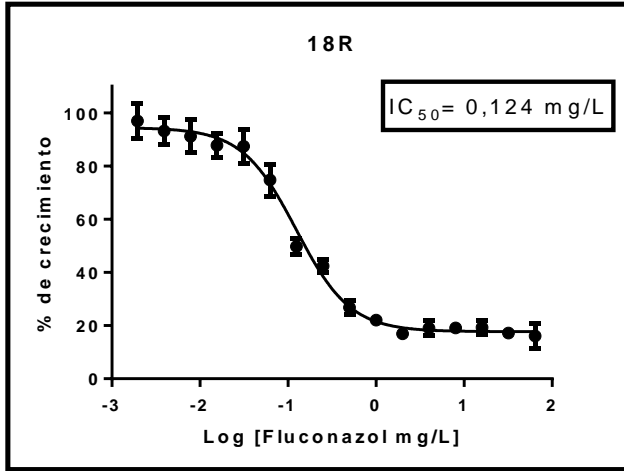
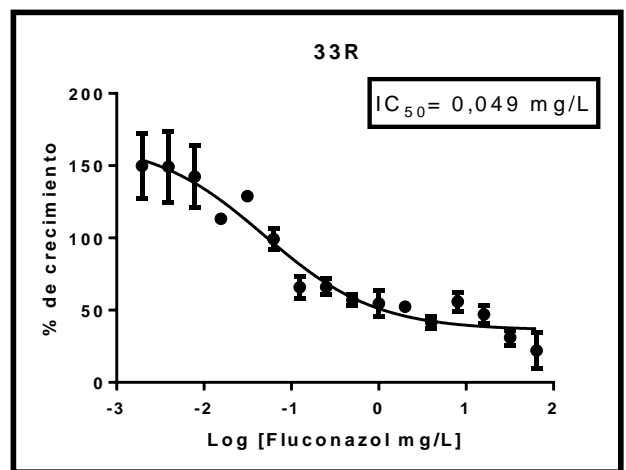
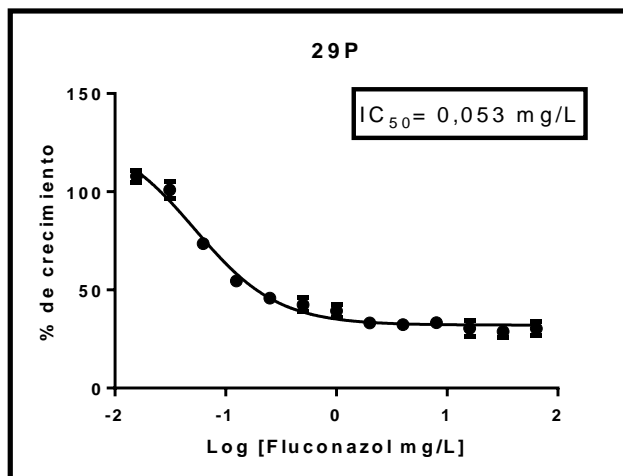
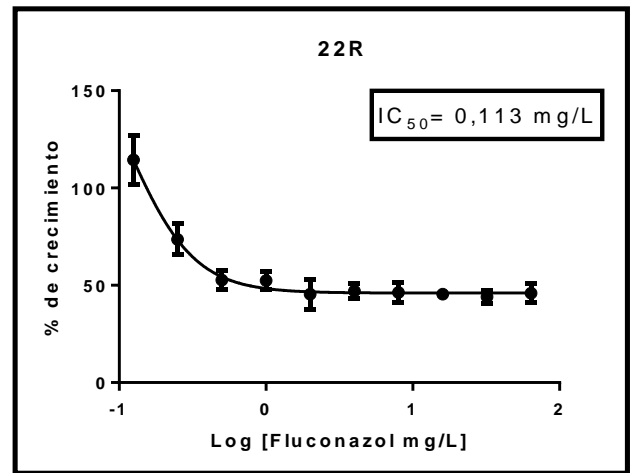
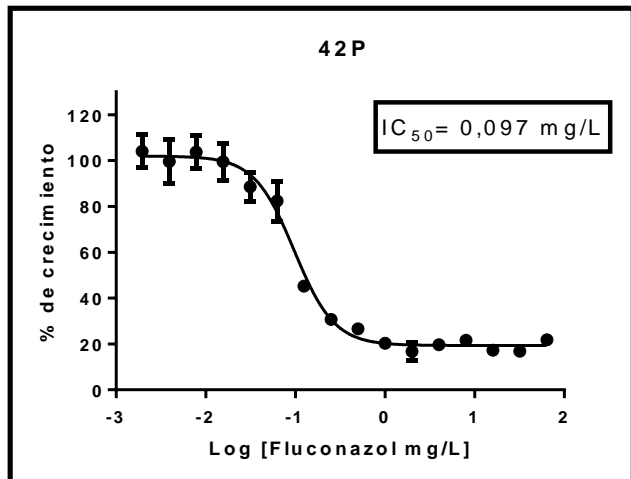
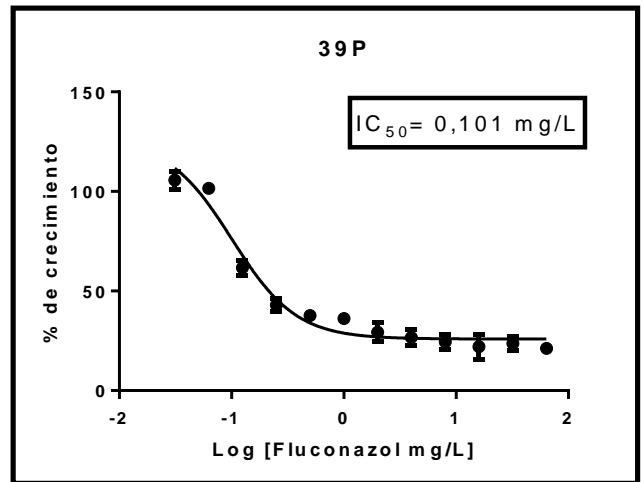
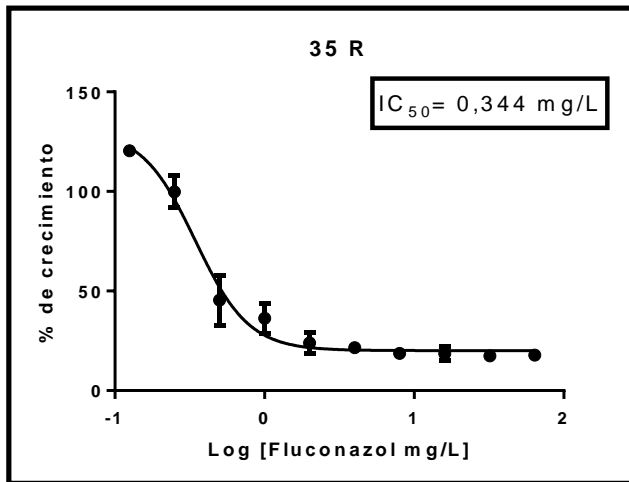


Figura 9. Determinación de susceptibilidad del fluconazol contra cepa control ATCC90029 Curva dosis respuesta de especie de referencia del género *Candida* ATCC 90029 (*C. albicans* sensible a Fluconazol). La figura corresponde a las curvas promedio de al menos 3 experimentos independientes + SD.

Luego se determinó la CIM de 18 cepas clínicas de *C. albicans* a fluconazol, mediante el método de microdilución para células planctónicas, de acuerdo con lo descrito en métodos (figura 10). Bajo las condiciones experimentales, el valor de la CIM corresponde a la concentración que inhibe el 50% del crecimiento de especies del género *Candida* (IC_{50}). Se puede observar que para cada cepa se obtuvo un comportamiento concentración-respuesta. Esto nos permitió realizar un análisis de regresión no lineal para obtener la curva sigmoideal que nos permite determinar el IC_{50} . Los IC_{50} obtenidos para cada cepa se detallan en la tabla 7.







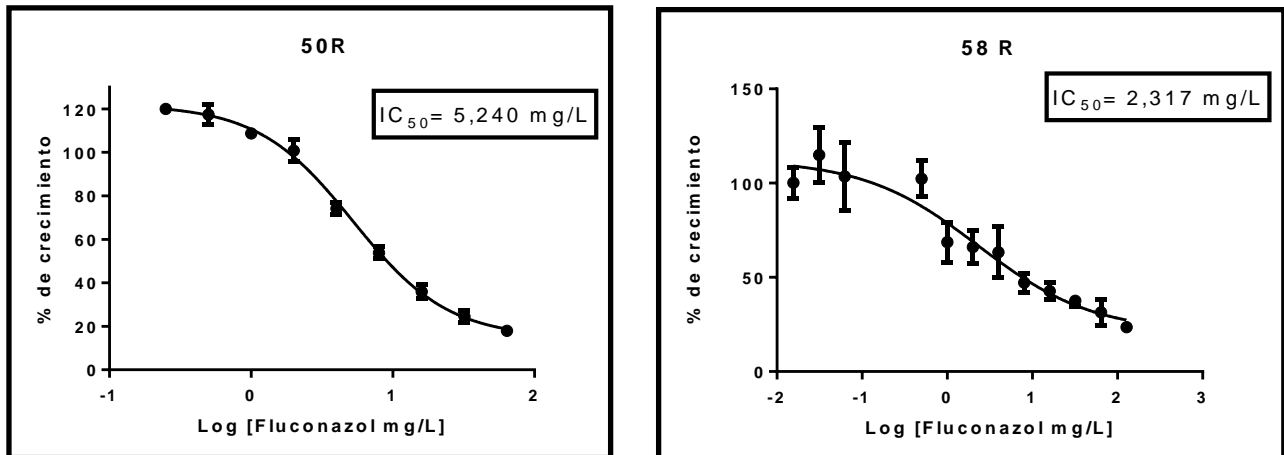


Figura 10. Determinación de viabilidad celular midiendo CIM de fluconazol para cepas clínicas de *Candida albicans* en su forma planctónica. Curva dosis- respuesta de 18 cepas clínicas (3P, 3R, 7R, 17P, 18R, 22R, 24R, 29P, 310, 31R, 32P, 33R, 35R, 39R, 42P, 50R, 58R) de *C. albicans*. La figura corresponde a las curvas promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

Al comparar las curvas dosis- respuesta de las cepas clínicas estudiadas, con la curva de la cepa control ATCC 90029 encontramos similitudes con algunas de ellas, llegando a 0% de viabilidad celular a concentraciones bajas de Fluconazol, comportándose como cepas susceptibles.

De las 18 cepas, 13 presentaron un gran porcentaje de inhibición a bajas concentraciones de fluconazol, acercándose a un 100% de inhibición de crecimiento, generando el efecto deseado en cepas clínicas de *C. albicans* en su forma planctónica.

Por otro lado, las cepas 22R, 29P, 33 R, 50 R y 58R tuvieron un comportamiento distinto, ya que se observó un porcentaje de inhibición cercano al 50% teniendo curvas dosis- respuestas similares a cepas resistentes a fluconazol. Sin embargo, de estas 5 cepas sólo la 50R y 58 R arrojaron valores de IC_{50} altos, mayores a 2 mg/L.

Al evaluar el comportamiento de los IC_{50} de las cepas clínicas estudiadas para fluconazol en células planctónicas (tabla 7), podemos ver que presentaron un rango amplio entre 0,023 mg/L y 5,24 mg/L. Sin embargo, al observar su distribución, el 89 % arrojó un IC_{50} menor a 1 mg/L.

Sólo 2 cepas tuvieron IC₅₀ mayores, la cepa 58R, presentó un IC₅₀ mayor a 2 mg/L y la cepa 50R la que obtuvo un IC₅₀ mayor a 5 mg/L. Este comportamiento marca una tendencia a necesitar menores concentraciones de fluconazol para su efectividad en las cepas clínicas de *C. albicans* cuando se encuentran en su forma planctónica.

Tabla 7. Valores de IC₅₀ de fluconazol en diferentes cepas clínicas de *Candida albicans* en su forma planctónica

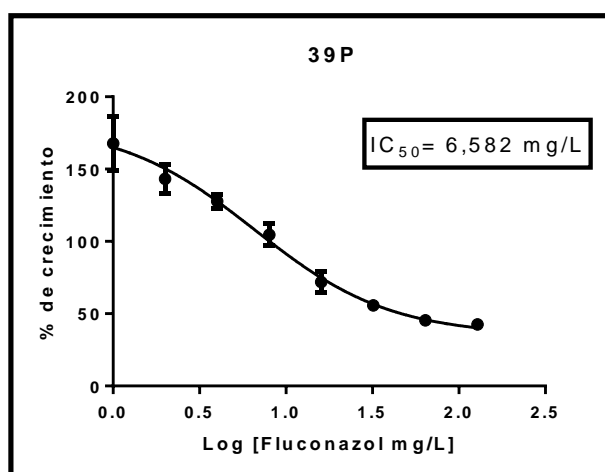
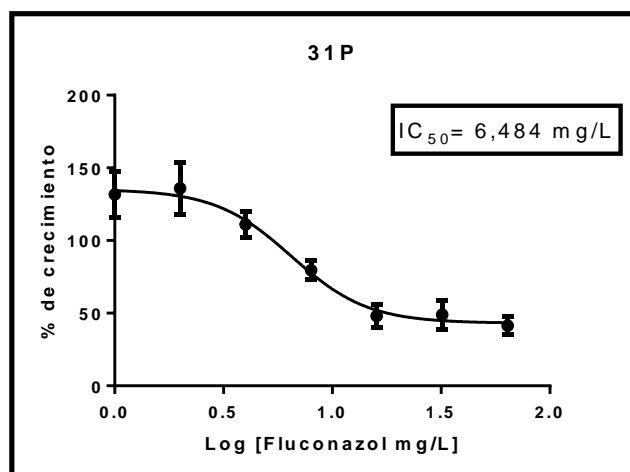
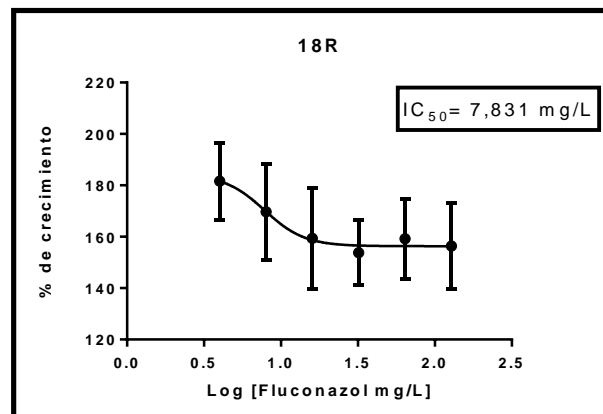
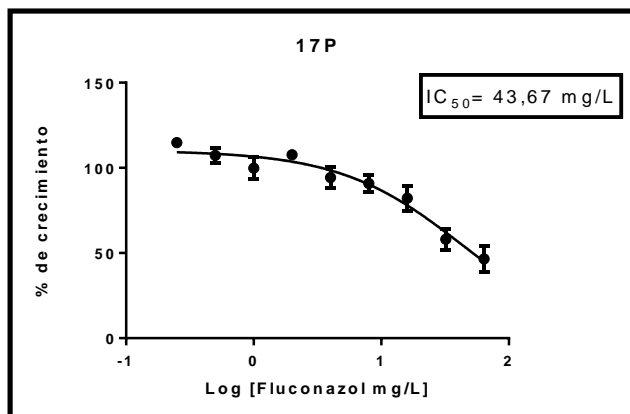
| Fluconazol | | Fluconazol | |
|-------------------|---------------|-------------------|---------------|
| 3P | 0,114 ± 0,008 | 31R | 0,035 ± 0,002 |
| 3R | 0,105 ± 0,012 | 32P | 0,041 ± 0,001 |
| 7R | 0,058 ± 0,005 | 33R | 0,049 ± 0,004 |
| 17P | 0,047 ± 0,004 | 35R | 0,344 ± 0,020 |
| 18R | 0,124 ± 0,080 | 39P | 0,101 ± 0,010 |
| 22R | 0,113 ± 0,050 | 39R | 0,048 ± 0,006 |
| 24R | 0,163 ± 0,010 | 42P | 0,097 ± 0,003 |
| 29P | 0,053 ± 0,008 | 50R | 5,24 ± 0,590 |
| 31P | 0,023 ± 0,012 | 58R | 2,317 ± 0,620 |

Los resultados corresponden al IC₅₀ están expresados en mg/L ± DE, de al menos 3 experimentos independientes para cada cepa.

Objetivo específico 2. Determinación del IC₅₀ de cepas clínicas de levadura *Candida albicans* en *biofilms*

De las 18 cepas estudiadas en células planctónicas se evaluaron 10 cepas en *biofilms* de *C. albicans* también mediante el método de microdilución. En estas cepas se evaluó el mismo rango de concentraciones de fluconazol evaluado en células planctónicas.

Al realizar los ensayos de susceptibilidad se determinó el IC₅₀ de estas cepas en *biofilms* de *C. albicans*. Seis de ellas presentaron IC₅₀ altos, con valores mayores a 6 mg/L (Figura 11). Sin embargo, en ninguna cepa se logró un 100% de inhibición, llegando sólo a un 50 % de inhibición a la concentración más alta ensayada.



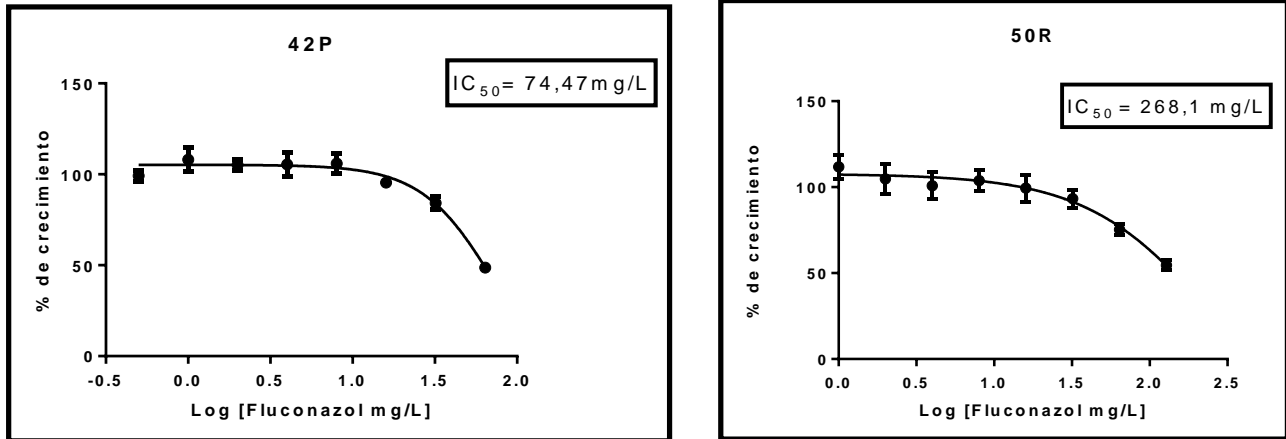


Figura 11. Determinación de viabilidad celular midiendo CIM de fluconazol en *biofilm* de cepas clínicas de *Candida albicans*. Curvas dosis- respuesta de 6 cepas clínicas (17P, 18R, 31P, 39P, 42P, 50R) en *biofilms* de *C. albicans*. La figura corresponde a las curvas promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

En las 6 cepas graficadas en la figura 11 se pudo calcular un valor de IC_{50} . De estas, 5 presentaron el mismo comportamiento: parten sobre el 100% de crecimiento y llegan sólo a un 50% de inhibición. En cambio, la cepa 18R se diferencia de las otras 5 porque se logró inhibir muy poco, sólo un 20 %, manteniéndose muy por sobre el crecimiento celular al compararlo con el control. Todas estas características concuerdan con cepas resistentes a fluconazol ya que no es efectiva la concentración evaluada, la cual ha sido aceptada para determinar la susceptibilidad de *C. albicans* a fluconazol por la EUCAST, siendo inviable utilizar concentraciones tan altas.

Por otro lado, en las otras 4 cepas graficadas en la figura 12 no se pudo determinar un valor de IC_{50} , pero de igual forma se logra evidenciar un comportamiento distinto a las cepas de la figura 11. Estas 4 cepas tuvieron en común que la viabilidad celular no disminuyó e incluso en algunas se generó el efecto contrario, aumentando el porcentaje de crecimiento celular a altas concentraciones de fluconazol. Sin embargo, al observar las curvas dosis respuesta graficadas en la figura 12 encontramos 2 comportamientos distintos:

Las cepas 22R y 3R, partieron con un 100 % de crecimiento y al aumentar las concentraciones de fluconazol lograron sobrepasar el 100% de crecimiento celular, manteniéndose alrededor de un 130% de crecimiento, al compararlo con el control.

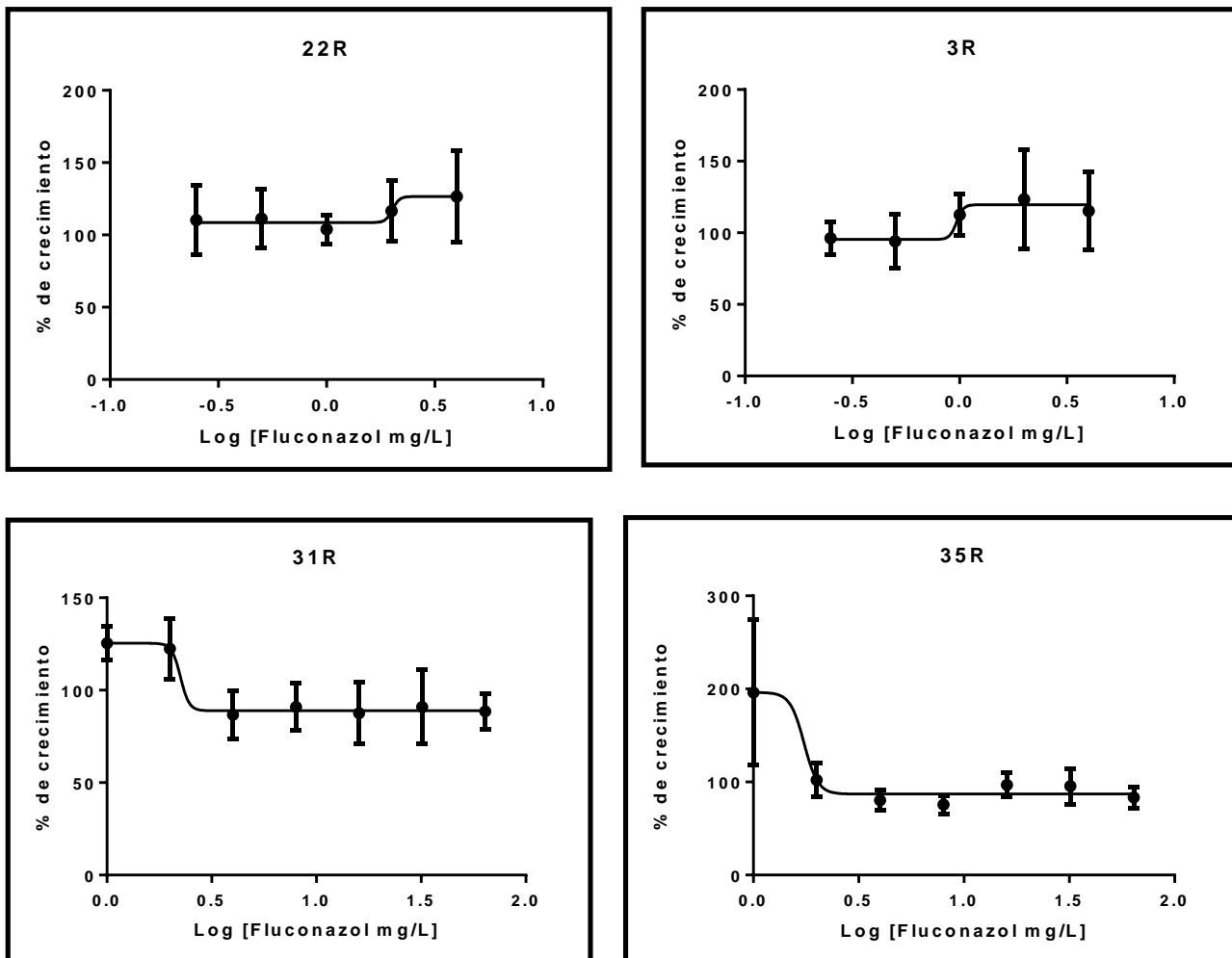


Figura 12. Curvas dosis- respuesta de fluconazol en *biofilm* de cepas clínicas de *Candida albicans*. Cepas ensayadas: 3R, 22R, 31R, 35R en *biofilms* de *C. albicans*. La figura corresponde a las curvas promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

Por otro lado, las cepas 31R y 35 R partieron sobre el 150% de crecimiento celular a bajas concentraciones de fluconazol, sin embargo, a medida que se aumentó la concentración de fluconazol bajo la viabilidad celular acercándose a un 100%, sin lograr acercarse al 50% de inhibición celular. Este cambio de comportamiento generando un aumento de la viabilidad celular sólo se evidenció en *biofilms* de *C.albicans*.

Tabla 8. IC₅₀ de Fluconazol en diferentes cepas clínicas de *Candida albicans* en *biofilms*

| Fluconazol | |
|-------------------|------------------------|
| Cepa | IC₅₀ |
| 3R | * > 64 mg/L |
| 17P | 43,67 ± 4,08 |
| 18R | 7,831 ± 2,92 |
| 22R | * > 64 mg/L |
| 31R | * > 64 mg/L |
| 31P | 6,484 ± 0,91 |
| 35R | * > 64 mg/L |
| 39P | 6,582 ± 2,37 |
| .42P | 74,47 ± 19,18 |
| 50R | 268,1 ± 24 |

Los resultados corresponden al IC₅₀ están expresados en mg/L ± DE, de al menos 3 experimentos independientes para cada cepa. * > 64 mg/L: no se pudo determinar IC₅₀ en las concentraciones probadas por esto se sugiere que es mayor a la concentración más alta estudiada.

Los valores de IC₅₀ obtenidos que se encuentran detallados en la tabla 10, tienen un amplio rango de concentraciones de 6,484 mg/L a 268,1 mg/L y en este caso el 100 % de los IC₅₀ calculados se encuentra sobre 6 mg/L marcando una tendencia a necesitar mayores concentraciones de fluconazol.

Al relacionar el comportamiento dosis respuesta con los valores de IC₅₀ podemos observar que en forma de *biofilm* a las concentraciones estudiadas, el fluconazol no es eficaz, siendo estas las concentraciones aceptadas por comité internacionales como EUCAST, por lo cual sería inviable utilizar estas concentraciones para tratar estas cepas cuando se encuentran en *biofilm*.

Objetivo específico 3. Caracterización de la susceptibilidad a fluconazol en cepas clínicas de levaduras del género *Candida albicans* en su forma planctónica y en *biofilms*, clasificando las cepas en sensibles y resistentes.

Luego de obtener los valores de IC₅₀ de fluconazol en cepas clínicas de *C. albicans* se caracterizó su susceptibilidad clasificándolas en susceptibles (S) o resistentes (R), tanto en su forma planctónica (Tabla 9) como en *biofilms* (Tabla 10), según los valores de corte informados por EUCAST para fluconazol en *C. albicans*.

Tabla 9. Clasificación de susceptibilidad a fluconazol en cepas clínicas de *Candida albicans* en su forma planctónica

| Fluconazol | | | Fluconazol | | |
|------------|------------------|-----------------|------------|------------------|-----------------|
| Cepa | IC ₅₀ | Susceptibilidad | Cepa | IC ₅₀ | Susceptibilidad |
| 3P | 0,114 | S | 31R | 0,035 | S |
| 3R | 0,105 | S | 32P | 0,041 | S |
| 7R | 0,058 | S | 33R | 0,049 | S* |
| 17P | 0,047 | S | 35R | 0,344 | S |
| 18R | 0,124 | S | 39P | 0,101 | S |
| 22R | 0,113 | S* | 39R | 0,048 | S |
| 24R | 0,163 | S | 42P | 0,097 | S |
| 29P | 0,053 | S* | 50R | 5,24 | R |
| 31P | 0,023 | S | 58R | 2,317 | I |

Los resultados corresponden al IC₅₀ están expresados en mg/L. S: susceptible, I: intermedia, R: resistente, S*: susceptibles según IC₅₀, sin embargo, al observar las curvas dosis respuesta presentan un comportamiento similar a cepas resistentes.

De las 18 cepas estudiadas en forma planctónica, 16 se clasificaron como susceptibles a fluconazol y dos como no susceptibles. En cuanto a la distribución el 89 % de las cepas tuvieron valores de IC₅₀ menores a 1mg/L. Por otro lado, la cepa 58R tuvo un IC₅₀ mayor a 2 mg/L y la cepa 50R presentó un IC₅₀ mayor a 5 mg/L.

Sin embargo, las cepas 22 R, 29R y 33R se caracterizaron como susceptibles según sus valores de IC₅₀, pero como se observó en las curvas dosis respuesta, estas cepas presentaron un comportamiento similar al de cepas resistentes a fluconazol, ya que a pesar de que el análisis arroja un valor de IC₅₀, el fluconazol no es capaz de inhibir más allá del 50% del

crecimiento aún a la concentración más alta ensayada.

Tabla 10. Clasificación de susceptibilidad a fluconazol en cepas clínicas de *Candida albicans* en *biofilms*

| Cepa | Fluconazol | |
|------|------------------|-----------------|
| | IC ₅₀ | Susceptibilidad |
| 3R | . * > 64 mg/L | R |
| 17P | 43,67 ± 4,08 | R |
| 18R | 7,831 ± 2,92 | R |
| 22R | . * > 64 mg/L | R |
| 31R | . * > 64 mg/L | R |
| 31P | 6,484 ± 0,91 | R |
| 35R | . * > 64 mg/L | R |
| 39P | 6,582 ± 2,37 | R |
| 42P | 74,47 ± 19,18 | R |
| 50R | 268,1 ± 24 | R |

Los resultados corresponden al IC₅₀ están expresados en mg/L. * > 64 mg/L: no se pudo determinar IC₅₀ en las concentraciones probadas por esto se sigue que es mayor a la concentración más alta estudiada.

Por otro lado, de las 10 cepas clínicas de *C. albicans* estudiadas en *biofilms* todas se clasificaron como resistentes según sus valores de IC₅₀ y comportamiento dosis respuesta.

El 100% de los valores obtenidos de IC₅₀ se encuentran por sobre 6 mg/L alcanzando valores hasta 268 mg/L, muy por el sobre del rango observado en los IC₅₀ de las mismas cepas en forma planctónica el cual se encuentra entre 0,023 mg/L y 5,24 mg/L. En 4 cepas no fue posible obtener un IC₅₀ ya que las curvas no se ajustaron al modelo concentración- respuesta.

7. DISCUSIÓN

El Fluconazol es el antimicótico más conocido y estudiado, es la alternativa de elección terapéutica habitual en infecciones fúngicas sistémicas o resistente a otras terapias. Su efectividad ha sido muy estudiada; desde los años 90 que se comenzaron a crear estándares internacionales de estudios de susceptibilidad de levaduras elaborados por EUCAST (Comité Europeo) y CLSI (Comité Norteamericano). Estos estándares permiten medir la CIM de las principales especies de levaduras oportunistas, demostrando así una adecuada reproducibilidad interlaboratorio en diversos estudios. Sin embargo, en general la determinación de la CIM de hongos filamentosos es más complicada y difícil de reproducir por el cambio morfológico, el cual genera un aumento en la densidad óptica de la muestra. Por esto la susceptibilidad *in vitro* no siempre predice el éxito de tratamiento y no siempre la resistencia *in vitro* se asocia a falla en el tratamiento (Tapia Paredes, 2009).

Para la determinación de CIM en este ensayo se utilizó un método adaptado de EUCAST, ya que se utilizó sales de tetrazolio MTT y XTT, métodos colorimétricos que se reducen fácilmente permitiendo una visualización y registro de resultados más claros. Estudios han demostrado una excelente concordancia entre los resultados obtenidos por métodos colorimétricos y los obtenidos de forma convencional siendo este último más engorroso, debido a la dificultad en la mediciones de turbidez en hongos filamentosos (Balouiri et al., 2016; Lass-Flörl et al., 2006; Meletiadis et al., 2000).

El efecto antifúngico del fluconazol ha sido ampliamente estudiado mediante ensayos de microdilución, logrando determinar valores para clasificar diferentes cepas de *C. albicans* en susceptibles o resistentes. Sin embargo, la mayoría de estos estudios fueron realizados en células planctónicas de *C. albicans* siendo que la evidencia ha demostrado de forma consistente que la forma de colonización de levaduras del género *C. albicans*, tanto en superficies biológicas como no biológicas es en *biofilms*, estructura que le confiere resistencia a antimicóticos tradicionales.

Los rangos aceptables de CIM de agentes antifúngicos son estudiados y determinados en cepas control de fuentes confiables, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos

Tipo (ATCC) o la Colección Nacional de Hongos Patógenos (NCPF). El rango informado por EUCAST de Fluconazol en diferentes cepas control de *C. albicans* es de 0,125- 64 mg/L (Rodríguez-Tudela, 2008; Tapia Paredes, 2009). Este fue el mismo rango utilizado en este estudio en células aisladas y en *biofilm*. Los IC₅₀ obtenidos en este estudio para células planctónicas tuvieron un rango de 0,023 - 5,34 mg/L encontrándose en el rango previamente estudiado y aceptado para Fluconazol en *C. albicans*. A diferencia de los IC₅₀ obtenidos para *biofilm*, los cuales tuvieron un rango más alto y amplio de 6,484- 268,1 mg/L, sobrepasando con creces la concentración máxima aceptada para fluconazol. Además, hubo 4 cepas de las 10 estudiadas en *biofilm* que tuvieron un comportamiento distinto, aumentando la viabilidad celular a altas concentraciones favoreciendo la formación de *biofilms*, evitando así que genere el efecto farmacológico deseado. Este efecto se ha descrito en otra familia de antimicóticos, el llamado efecto paradójico de las equinocandinas, donde cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol tratadas con distintas concentraciones de equinocandinas aumentan su viabilidad celular con respecto a los controles no tratados (Cantón et al., 2007; Walraven et al., 2015). Sin embargo, este efecto no ha sido descrito anteriormente para fluconazol.

Al caracterizar la susceptibilidad de cepas de *C. albicans* a fluconazol se nota un claro aumento en la resistencia cuando se encuentra en *biofilm* en comparación con células aisladas. De las 18 cepas estudiadas en su forma planctónica sólo una de ellas fue clasificada como resistente, la cepa 50R con un IC₅₀ de 5,24 mg/L. Por otro lado, de las 10 cepas estudiadas en *biofilms* todas fueron clasificadas como cepas resistentes, 6 de ellas obtuvieron rangos de IC₅₀ de 6,484- 268,1 mg/L. En cambio, las otras 4 cepas no arrojaron valores de IC₅₀ para el rango estudiado, lo que nos hace pensar que se encuentra sobre la concentración máxima estudiada 64 mg/L.

Además, en *biofilms* de *C. albicans* los IC₅₀ fueron muy altos, llegando incluso a ser 50 veces más alto en comparación a los obtenidos en células planctónicas y hasta 4 veces por sobre el valor más alto aceptado por EUCAST, lo que hace inviable utilizar estas concentraciones.

Al revisar en la literatura estudios de susceptibilidad a fluconazol mediante método de

microdilución, se han observado los siguientes rangos de distribución para *C. albicans*: Entre 3- 5 % de las cepas estudiadas fueron caracterizadas como resistentes, 5-10 % fueron caracterizadas como sensibles dependientes de la dosis y entre 85-92 % fueron clasificadas como susceptibles (Diaz et al., 2016; Won et al., 2015; Xu et al., 2008). Datos que son consistentes con nuestro estudio en células planctónicas.

En cuanto a estudios en *biofilms* de *C. albicans*, se enfocan mayoritariamente en cómo se forma la resistencia que esta distribución le confiere y mediante qué métodos biológicos ocurre. Sin embargo, no se encontraron investigaciones donde se estudiara el efecto anti-*biofilm* del fluconazol en cepas clínicas de *C. albicans*. Siendo de vital importancia estudiar la susceptibilidad de antimicóticos en *biofilms* de *C. albicans*, ya que se observó un cambio radical de comportamiento lo cual se relaciona con el aumento de resistencia a tratamientos comunes.

Esta investigación es una de las primeras en comparar el efecto antifúngico de fluconazol en cepas clínicas de pacientes con estomatitis subprotésica tanto en células planctónicas como en *biofilms* de *C. albicans*. Si bien es necesario seguir investigando el efecto anti-*biofilm* de otros fármacos, se demuestra el cambio de comportamiento de *C. albicans* al formar *biofilms* y el aumento de resistencia a antimicóticos clásicos como fluconazol necesitando dosis altas.

Con los resultados y el análisis realizado en este trabajo se puede determinar que la hipótesis planteada fue aceptada, ya que se demostró que hay una mayor resistencia a fluconazol en *biofilms* de cepas clínicas de *C. albicans* en comparación a cuando se encuentran en forma planctónica, por lo que el fluconazol no tiene efecto anti-*biofilm* siendo esta la forma habitual de encontrar *C. albicans* en medios biológicos.

Por otro lado, es importante educar al paciente evitando factores de riesgo y entregándole herramientas para su cuidado oral haciendo hincapié en mantener una buena higiene oral, buen uso y cuidado de prótesis removibles y mantener controles anuales, siendo primordial la prevención en la terapia de estomatitis subprotésica.

Este trabajo demuestra la necesidad de estudiar las diferentes terapias antifúngicas en

biofilms de *C. albicans*, ya que la susceptibilidad cambia radicalmente al encontrarse de esta forma y no aisladas como se estudian los antifúngicos. Otra opción sería utilizarlo en conjunto con algún fármaco que disgregue el *biofilm* y de esa forma evitar recidiva.

8. CONCLUSIONES

- La mayoría de las cepas clínicas estudiadas se comportaron como susceptibles frente a fluconazol al determinar su CIM
- El Fluconazol demostró tener efecto antifúngico en células planctónicas de *C. albicans*, sin embargo, no presentó efecto anti- *biofilm* siendo esta la forma habitual de encontrar *C. albicans* en ambientes biológicos.
- La resistencia a fluconazol aumenta en *biofilms* de *C. albicans* en comparación con células planctónicas, llegando a IC₅₀ muy altos, inviabilizando para ser utilizados en tratamientos.
- Es necesario realizar más estudios de susceptibilidad de diferentes antimicóticos en *biofilms* de *C. albicans* de tal manera de poder tener mayor certeza del éxito de la terapia a largo plazo.

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Abaci, O., Haliki-Uztan, A., Ozturk, B., Toksavul, S., Ulusoy, M., & Boyacioglu, H. (2010). Determining candida spp. incidence in denture wearers. *Mycopathologia*, 169(5), 365–372. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9275-8>
- Altarawneh, S., Bencharit, S., Mendoza, L., Curran, A., Barrow, D., Barros, S., Preisser, J., Loewy, Z. G., Gendreau, L., & Offenbacher, S. (2013). Clinical and Histological Findings of Denture Stomatitis as Related to Intraoral Colonization Patterns of *Candida albicans*, Salivary Flow, and Dry Mouth. *Journal of Prosthodontics*, 22(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2012.00906.x>
- Avon, S. L., Goulet, J. P., & Deslauriers, N. (2007). Removable acrylic resin disk as a sampling system for the study of denture biofilms in vivo. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 97(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2006.12.001>
- Ayuso-Montero R, Torrent-Collado J, L.-L. J. (2004). Estomatitis protésica : puesta al día Denture stomatitis : update. *RCOE [Online]*, 9(6), 657–662.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bengel, W., & Bornstein, M. M. (2017). Patología oral Candidiasis orales Patología oral. *Quintessence*, 24(1), 51–55.
- Bizarro, S. A., & Goes, T. F. Van Der. (2006). Análisis microscópico de la adherencia de *Candida albicans* in vitro sobre resinas acrílicas utilizadas para bases de dentaduras procesadas con tres diferentes técnicas. *Revistas Odontológica Mexicana*, 10(4), 167–172.
- Bonilla R., Y., Moreno M., V., Muñoz H., B., & Palma C., G. (2012). Adherencia in vitro de *Candida albicans* en tres diferentes acondicionadores de tejidos usados en prostodoncia total. *Revista Odontológica Mexicana*, 16(1), 40–45.
- Braunsdorf, C., & Leibundgut-Landmann, S. (2018). Modulation of the fungal-host interaction by the intra-species diversity of *C. Albicans*. *Pathogens*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens7010011>
- Brevis azocar, P., Cancino Marchant, J., & Cantín López, M. (2008). Estomatitis subprótesis: estudio clínico y microbiológico de candida. *Int. j. Odontostomatol. (Print)*, 2(1), 101–108.
- Caballero, B., Porto, D., Baracaldo, C., Correspondencia, C., & Barata Caballero, D. D. (2002). Estomatitis protésica. Aspectos clinicos y tratamiento. *Prof. Dent*, 5(10), 622–627.
- Cantón, E., Pemán, J., Romero, M., & Gobernado, A. V. M. (2007). Original Actividad fungicida y efecto paradójico. 20(Nº 4), 433–441.

- Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine*, 5(FEB), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- Cueto, A., Martínez, R., Niklander, S., Deichler, J., Barraza, A., & Esguep, A. (2013). Prevalence of oral mucosal lesions in an elderly population in the city of Valparaíso, Chile. *Gerodontology*, 30(3), 201–206. <https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2012.00663.x>
- Deveau, A., & Hogan, D. A. (2011). Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 692, 219–233. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-971-0_16
- Díaz Caballero, A., Vivas Reyes, R., Ahumado Monterrosa, M., Arévalo Tovar, L., Cabrales Salgado, R., & Herrera Herrera, A. (2011). Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión Biofilms like expression of quorum sensing mechanism: A revision. *Avances En Periodoncia*, 23(3), 195–201.
- Díaz, M. C., Camponovo, R., Araya, I., Cerda, A., Santander, M. P., & Carrillo-Muñoz, A. J. (2016). Identificación y sensibilidad antifúngica in vitro de *Candida* spp. de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina. *Revista Española de Quimioterapia*, 29(3), 151–154.
- Ercalik-Yalcinkaya, S., & Özcan, M. (2015). Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. *Journal of Prosthodontics*, 24(4), 271–278. <https://doi.org/10.1111/jopr.12208>
- EUCAST. (2020). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents*. <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifunals/>
- Figueiral, Fonseca, P., Lopes, M. M., Pinto, E., Pereira-Leite, T., & Sampaio-Maia, B. (2015). Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral *Candida albicans* Susceptibility Profile and Genotypic Variability. *The Open Dentistry Journal*, 9(1), 46–51. <https://doi.org/10.2174/1874210601509010046>
- Figueiral, M. H., Azul, A., Pinto, E., Fonseca, P. A., Branco, F. M., & Scully, C. (2007). Denture-related stomatitis: Identification of aetiological and predisposing factors - A large cohort. *Journal of Oral Rehabilitation*, 34(6), 448–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2007.01709.x>
- Fox, E., & Nobile, C. (2013). The Role of *Candida albicans* Biofilms in Human Disease. *Candida Albicans: Symptoms, Causes and Treatment Options*, May, 1–24. <https://www.researchgate.net/publication/257921622>
- Garaicoa, J. L., Fischer, C. L., Bates, A. M., Holloway, J., Avila-Ortiz, G., Guthmiller, J. M., Johnson, G. K., Stanford, C., & Brogden, K. A. (2018). Promise of Combining Antifungal Agents in Denture Adhesives to Fight *Candida* Species Infections. *Journal of Prosthodontics*, 27(8), 755–762. <https://doi.org/10.1111/jopr.12565>

- Gendreau, L., & Loewy, Z. G. (2011). Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *Journal of Prosthodontics*, 20(4), 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x>
- Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
- Gutiérrez, C. G., Bustos Medina, L., Sanchez, M., Zaror Cornejo, L., & Zambrano, M. E. (2013). Estomatitis Subprotésica en Pacientes de la IX Región, Chile. *International Journal of Odontostomatology*, 7(2), 207–213. <https://doi.org/10.4067/s0718-381x2013000200008>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hilgert, J. B., Giordani, J. M. do A., de Souza, R. F., Wendland, E. M. D. R., D'Avila, O. P., & Hugo, F. N. (2016). Interventions for the Management of Denture Stomatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Geriatrics Society*, 64(12), 2539–2545. <https://doi.org/10.1111/jgs.14399>
- Hong, G., Maeda, T., Li, Y. A., Sadamori, S., Hamada, T., & Murata, H. (2010). Effect of PMMA polymer on the dynamic viscoelasticity and plasticizer leachability of PEMA-based tissue conditioners. *Dental Materials Journal*, 29(4), 374–380. <https://doi.org/10.4012/dmj.2009-134>
- Hu, L., He, C., Zhao, C., Chen, X., Hua, H., & Yan, Z. (2019). Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. *Microbial Pathogenesis*, 134(February), 103575. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103575>
- Kang, S. H., Lee, H. J., Hong, S. H., Kim, K. H., & Kwon, T. Y. (2013). Influence of surface characteristics on the adhesion of *Candida albicans* to various denture lining materials. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(1), 241–248. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.671360>
- Lam, O. L. T., Bandara, H. M. H. N., Samaranayake, L. P., Mcgrath, C., & Li, L. S. W. (2012). Oral health promotion interventions on oral yeast in hospitalised and medically compromised patients: A systematic review. In *Mycoses* (Vol. 55, Issue 2, pp. 123–142). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02062.x>
- Lass-Flörl, C., Cuenca-Estrella, M., Denning, D. W., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2006). Antifungal susceptibility testing in *Aspergillus* spp. according to EUCAST methodology. *Medical Mycology*, 44(SUPPL. 1), 319–325. <https://doi.org/10.1080/13693780600779401>
- Lee Muñoz, X., Cajas Cajas, N., Gómez Carranza, L., Vergara Núñez, C., Ivankovic Silva, M.,

- & Astorga Bustamante, E. (2015). Ocurrencia de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica antes y después del tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 8(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2015.02.005>
- Lee, X., Gómez C, L., Vergara N, C., Astorga B, E., Cajas C, N., & Ivankovic S, M. (2013). Asociación entre Presencia de Levaduras del Género *Candida* y Factores del Paciente Adulto Mayor con y sin Estomatitis Protésica. *International Journal of Odontostomatology*, 7(2), 279–285. <https://doi.org/10.4067/s0718-381x2013000200018>
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64, 357–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Lohse, M.B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Lohse, Matthew B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>
- López, E. M., & Marín, A. F. (2001). La candidiasis como manifestación bucal en el SIDA. *Revista Cubana de Estomatología*, 38(1), 25–32.
- Lynge Pedersen, A. M., Nauntofte, B., Smidt, D., & Torpet, L. A. (2015). Oral mucosal lesions in older people: Relation to salivary secretion, systemic diseases and medications. *Oral Diseases*, 21(6), 721–729. <https://doi.org/10.1111/odi.12337>
- Meletiadis, J., Meis, J. F. G. M., Mouton, J. W., Donnelly, J. P., & Verweij, P. E. (2000). Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 2949–2954. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.8.2949-2954.2000>
- Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>
- MINSAL. (2010). *Guía Clínica 2010 Salud Oral Integral para adultos de 60 años*. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7221747c2c9484b7e04001011f0141a4.pdf>
- MINSAL. (2019). *INFORME ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017: Salud Bucal*. 1–51. http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2021/03/Informe_Salud_Bucal_ENS_2016_17.pdf
- Nett, J. E., Marchillo, K., Spiegel, C. A., & Andes, D. R. (2010). Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infection and Immunity*, 78(9), 3650–3659. <https://doi.org/10.1128/IAI.00480-10>

- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease . *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Otero E, R., Peñamaría M, M., Rodríguez M, P., Martín B, B., & Blanco A, C. (2015). *Oral candidosis in the older patient*.
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(May), 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- Pereira-Cenci, T., Del Bel Cury, A. A., Crielaard, W., & Ten Cate, J. M. (2008). Development of *Candida*-associated denture stomatitis: New insights. *Journal of Applied Oral Science*, 16(2), 86–94. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572008000200002>
- Pozo, L., & Del Cantón, E. (2016). Revista Iberoamericana de Micología Candidiasis asociada a biopelículas. *Rev Iberoam Micol*, 33(3), 176–183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.06.004>
- Rivera, C., Droguett, D., & Arenas-Márquez, M. J. (2017). Oral mucosal lesions in a Chilean elderly population: A retrospective study with a systematic review from thirteen countries. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(2), e276–e283. <https://doi.org/10.4317/jced.53427>
- Rodríguez-Tudela, J. L. (2008). EUCAST definitive document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(4), 398–405. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01935.x>
- Rodríguez, J., Miranda, J., Morejón, H., & Santana Garay, J. C. (2002). Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2), 187–233.
- Sadeghi, G., Ebrahimi-Rad, M., Mousavi, S. F., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Emergence of non-*Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *Journal de Mycologie Medicale*, 28(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.008>
- Sakar, O., Sulun, T., Bilhan, H., & Ispirgil, E. (2013). Does the Presence of Anterior Mandibular Teeth Increase the Incidence of Denture Stomatitis? *Journal of Prosthodontics*, 22(3), 174–178. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2012.00924.x>
- Skupien, J. A., Valentini, F., Boscato, N., & Pereira-Cenci, T. (2013). Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: A systematic review. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 110(5), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2013.07.003>
- Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 737–748. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>

- Tapia Paredes, C. V. (2009). An update on antifungal susceptibility testing. *Revista Chilena de Infectología*, 26(2), 144–150. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000200005>
- Velazco, G., Ortiz, R., Arellano, L., Bustillos, L., & González, A. (2009). Evidencia microscópica de la presencia de *Candida albicans* en bases protésicas retiradas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología*, 46(2), 13–14.
- Velazquez, A., Florentín, G. D., & Defazio, D. J. (2017). Frecuencia de estomatitis subprotésica en pacientes portadores de prótesis dentales removibles. *Revista Facultad de Ciencias de La Salud UDES*, 4(1), 45. <https://doi.org/10.20320/rfcsudes.v4i1.106>
- Walraven, C. J., Bernardo, S. M., Wiederhold, N. P., & Lee, S. A. (2015). Paradoxical antifungal activity and structural observations in biofilms formed by echinocandin-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Journal of Medical Mycology*, 52(2), 131–139. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt007>. Paradoxical
- Warnakulasuriya, S. (2019). White, red, and mixed lesions of oral mucosa: A clinicopathologic approach to diagnosis. *Periodontology 2000*, 80(1), 89–104. <https://doi.org/10.1111/prd.12276>
- Williams, D. W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., & Lewis, M. A. O. (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. *Periodontology 2000*, 55(1), 250–265. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x>
- Won, E. J., Shin, J. H., Choi, M. J., Lee, W. G., Park, Y. J., Uh, Y., Kim, S. Y., Lee, M. K., Kim, S. H., Shin, M. G., Suh, S. P., & Ryang, D. W. (2015). Antifungal susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species from nine hospitals in Korea: Application of new antifungal breakpoints and relationship to antifungal usage. *PLoS ONE*, 10(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118770>
- Xu, Y., Chen, L., & Li, C. (2008). Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(4), 798–804. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn015>
- Zomorodian, K., Haghghi, N. N., Rajaei, N., Pakshir, K., Tarazooie, B., Vojdani, M., Sedaghat, F., & Vosoghi, M. (2011). Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Medical Mycology*, 49(2), 208–211. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.507605>